PERIODICAL
Fukuoka, Japan. Kyushu Univ. Dept. of Fish
& the Fish. Res. Lab.
#1 Contributions.

Contributions from the Department of Fisheries

and

the Fishery Research Laboratory, Kyushu University

No. 1 (1942-1954)

LIBRARY,

JUN 23 1960

FISH & WILDLIFE SERVICE

2552 60

LIBRARY
JUN 23 1960
FISH & WILDLIFE SERVICE

Foreword

After the Department of Fisheries and the attached Fishery Research Laboratory of Kyushu University were founded in 1941 and 1944, respectively, the research activities were greatly inhibited due to the outbreak of World War II and the restoration from its damage. After the War, activities were resumed and an increasing number of scientific papers have been published in various journals and bulletins.

It is, of course, difficult to obtain all of the available reports on the science of fisheries, particularly those which are carried out in Japan. This is perhaps one of the reasons why there are frequent duplication in and neglect of related works in this field.

It is hoped that this bulletin which is a compilation of all the scientific achievements from our institute will render our research works available to fisheries research organizations in foreign countries. The exchange of your scientific publications with this bulletin will be acknowledged with appreciation and will serve to promote the advancement of the science of fisheries in the whole world.

September, 1959

Department of Fisheries and
Fishery Research Laboratory,
Kyushu University,
Fukuoka, Japan

List of periodicals wherein published

Botanical Magazine, Tokyo	(植物学雑誌)
Breviora	
Bulletin of the Biogeographical Society of Japan	(日本生物地理学会々報)
Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries	(日本水産学会誌)
Collecting and Breeding	(採集と飼育)
Japanese Journal of Ecology	(日本生態学会誌)
Japanese Journal of Ichthyology	(魚類学雑誌)
Japanese Journal of Limnology	(陸水学雑誌)
Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan	(日本農芸化学会誌)
Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University	(九大農学部紀要)
Journal of Japanese Botany	(植物研究雑誌)
Journal of the Oceanographical Society of Japan	
Kagaku	(科学)
Nutrition and Food	
Proceedings of the Japan Academy	(日本学士院紀事)
Proceedings of the 7th Pacific Science Congress	
Publications of the Seto Marine Biological Laboratory	
Records of Oceanographic Works in Japan	
Research in the effects and influences of the Nuclear Bomb Test Explosions (Tokyo)	
Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University	(九大農学部学芸雑誌)
Seibutsu	(生物)

Contributions from the Department of Fisheries and the Fishery Research Laboratory, Kyushu University. No. 1 (1942–1954)

Paper with asterisk is not included in this series.

—— Biological Section ——

*MATUDAIRA, T.	On inorganic sulphides as a growth-promoting ingredient for diatom	Proc. Imp. Acad., **18**(2): 107～116 (1942)
*IMAI, S.	On some deep-sea angler-fishes obtained in Sagami and Suruga Bay	J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **7**(2): 37～48 (1942)
*MATUDAIRA, T.	On the physiological factors of clover-extract acting upon the growth of *Daphnia* and *Scenedesmus* クローバを培養源とした場合のミヂンコ及セネデスムスの増殖要因に関する生化学的研究	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **12**(1): 1～17 (1943)
*AIKAWA, H., HANAMURA, N.	On age and race of some salmoid fishes	J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **9**(1): 21～31 (1948)
*AIKAWA, H.	The magnitude of population and King-crab, *Paralithodes camtshatica* (TILESIUS)	Ibid., **9**(1): 41～49 (1948)
*AIKAWA, H., IRIE, H.	The magnitude and fishing rate of the population of snapper, *Pagrosomus major* (TEMMINCK et SCHLEGEL)	Ibid., **9**(1): 51～57 (1948)
*IMAI, S.	On *Aphyocypris chinoencis* GÜNTHER collected in the vicinity of Fukuoka 福岡市付近に産するヒナモロコについて	Seibutsu, **3**(3～4): 121～123 (1948)
*SEGAWA, S.	A new Laminariaceous alga found in Izu	J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **9**(1): 59～63 (1948)
*TSUKAHARA, H.	The relation between the secondary sex-characters and the spawning habits in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* CANTOR ドジョウの二次性徴と産卵習性との関係に就いて	Seibutsu, **3**(2): 64～69 (1948)
*TSUKAHARA, H.	Experimental induction of courtship and coupling in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* CANTOR ドジョウの求愛・産卵行動とその誘発	Collecting and Breeding, **10**(12): 354～356 (1948)

*Segawa, S.	The gonimoblast development in Ceramiaceous algae of Japan - I	J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **9**(2) : 143～147 (1949)
*Segawa, S.	Five Floridean genera new to Japan 我国暖海産フローラに加えらるべき紅藻の5属	J. Japan. Botany, **24**(1～12) : 159～165 (1949)
*Aikawa, H., Hayashi, T., Hanamura, N.	On the mass reaction of gold fish and carp against the toxic substance	J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **9**(3) : 241～254 (1950)
*Aikawa, H., Hayashi, T., Furuno, Y.	Vertebral count and growth of Japanese Anchovy, *Engraulis japonicus* Temminck et Schlegel	Ibid., **9**(3) : 255～269 (1950)
*Segawa, S.	The gonimoblast development in Ceramiaceous algae of Japan - II	Ibid., **9**(3) : 235～240 (1950)
*Dôtu, Y.	On the sound producing mechanism of a scorpaenoid fish, *Sebastiscus marmoratus* カサゴの発音機構について	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **13**(1～4) : 286～288 (1951)
*Tsukahara, H.	List of fishes of Chikugo and Yabe River 筑後川・矢部川魚類目録	Ibid., **13** (1～4) : 289～293 (1951)
*Uchida, K.	Notes on a few cases of mimicry in fishes 魚類に於ける擬態の数例	Ibid., **13** (1～4) : 294～296 (1951)
*Segawa, S., Nakamura, M.	Intertidal vegetation on the coast of Fukuyoshi, Fukuoka Pref. 筑前福吉海岸の潮間帯海藻群落	Japan. J. Ecology, **1** (4) : 196～200 (1952)
*Tsukahara, H.	The life history and habits of the sculpin, "Yama-no-kami", *Trachidermus fasciatus* Heckel	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **12** (3) : 225～238 (1952)
*Segawa, S.	Position of Hachijo from the standpoint of algal distribution	Proc. 7 th Pacific Sci. Congr., 5 : 1～4 (1953)
*Dôtu, Y.	On the life history of a goby, *Chaenogobius castanea* (O' Shaughnessy) ビリンゴの生活史	Japan. J. Ichthyol., **3** (3～5) : 133～138 (1954)
*Fujita, S., Ueno, M.	On the development of the egg and prelarval stages of *Siganus fuscescens* (Houttuyn) by artificial insemination アイゴの人工授精による発生経過に就いて	Ibid., **3** (3～5) : 129～132 (1954)

*MITO, S.	Breeding habits of a blennioid fish, *Salarias enosimae* カエルウオの産卵習性	Japan. J. Ichthyol., **3** (3～5) : 144～152 (1954)
*TSUKAHARA, H.	Breeding habits of the fresh-water sucker, *Abbottina rivularis* (BASILEWSKY) ツチフキの産卵習性	Ibid., **3** (3～5) : 139～143 (1954)
*UENO, M., FUJITA, S.	On the development of the egg of *Sillago sihama* (FORSKÅL) キスの卵発生	Ibid., **3** (3～5) : 118～120 (1954)

—— Chemical Section ——

SEISI, R., TOMIYAMA, T.	On the unusual death of the oyster in relation to the sulfide-contents in the bottom deposits of the brackish water Lake Hamanako, Sizuoka Prefecture 浜名湖に於ける牡蠣の斃死と底土中の硫化物含量との関係	J. Oceanogr. Soc. Japan, **1** (1, 2) : 75～84 (1942)
SEISI, R., INABA, S., TOMIYAMA, T.	On the limnological change unfavorable for the fauna and flora of Sanaruko, Sizuoka Prefecture 佐鳴湖の悪変現象に就いて	Japan. J. Limnology, **11** (4) : 137～145 (1942)
*TSUCHIYA, Y., IMAI, S.	Studies on the water plant culture (1) Preliminary report on the culture of *Lemna paucicostata* HEGELM and *Spirodela polyrhiza* SCHLEID 水草の培養に関する研究（第1報）ウキクサ及びアヲウキクサの培養に関する予備的実験	J. Agr. Chem. Soc. Japan, **19** (5) : 279～384 (1943)
*TSUCHIYA, Y.	Lethal effect of sulphureous compounds on *Daphnia pulex* ミジンコに対する硫黄化合物の毒性に就て	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **13** (3) : 113～114 (1947)
*TSUCHIYA, Y.	On a new substitute for blood, alginic acid, prepared from the brown algae "アルギン" 酸代用血に就いて	Ibid., 13 (2) : **13** (2) : 55～56 (1947)
TOMIYAMA, T.	Biochemical studies on nutrition under special environment. I. An apparatus capable of keeping the reduced pressure constant	J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **9** (1) : 71～73 (1948)

TOMIYAMA, T., YABUKI, T., NAKAO, S.	II. The effect of reduced pressure upon digestibility	J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **9** (1): 75～81 (1948)
TOMIYAMA, T., SUGIHARA, T.	Biochemical studies on the liquefaction of fish body I. On basic conditions for the liquefaction 魚体の液化に関する生化学的研究 I. 魚体液化の基礎条件について	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **13** (1～4): 297～305 (1951)
TOMIYAMA, T., YONE, Y., ISHIO, S.	II. On the effectiveness of "solubilized fish" to the growth of a plant, *Lemma paucicostata* HEGELM II. 魚体液化物のアオウキクサ成長促進効果について	Ibid., **13** (1～4): 306～312 (1951)
YONE, Y., TOMIYAMA, T.	Studies on antianaemic ingredients of the liver. I. On the method for the estimation of antianaemic potency by the phenylhydrazine-anaemia 肝臓の造血成分に関する研究 I. Phenyl-hydrazine 貧血による造血効力の測定法について	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **17** (1): 27～32 (1951)
YONE, Y., TOMIYAMA, T.	II. The estimation of antianaemic potency in livers of several marine animals II. 数種水産動物肝臓の造血効力の測定	Ibid., **17** (1): 33～37 (1951)
MASUYA, T., TOMIYAMA, T., YONE, Y.	III. The effectiveness of the liver extract upon the atomic bomb-disease III. 原子爆弾症に対する効果	Ibid., **17** (10): 329～335 (1952)
TOMIYAMA, T., YABUKI, T., YONE, Y.	IV. On a liver component effective to fortify the tolerant capacity for the high altitude IV. 肝臓の高空耐性増強効果について	Ibid., **18** (7): 299～304 (1953)
TOMIYAMA, T., YABUKI, T., YONE, Y.	V. A similarity between the antianaemic ingredient and a liver component effective to fortify the tolerant capacity for high altitude V. 肝臓の高空耐性増強成分と造血成分との関係	Ibid., **18** (7): 305～309 (1953)
YONE, Y., TOMIYAMA, T.	VI. On the growth-promoting effect of liver extract and its purified fractions upon *Lemna paucicostata* HEGELM VI. アオウキクサに対する成長促進効果に就て	Ibid., **18** (12): 659～663 (1953)

YONE, Y., TOMIYAMA, T.	VII. The growth-promoting effect of several antianaemic substances upon *Lemna paucicostata* HEGELM Ⅶ. アオウキクサに対する数種造血成分の生長促進効果	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **18** (12) : 664～668 (1953)
YONE, Y., TOMIYAMA, T.	VIII. Alleviative effect on promin-induced anaemia due to administration of vitamin B_{12} and of a purified fraction of liver Ⅷ. 肝精製物のプロミン貧血に対する抑制効果	Ibid., **19**(5) : 649～652 (1953)
YONE, Y., TOMIYAMA, T.	IX. Alleviative effect promin-induced anaemia due to folic acid and to a combination of folic acid with vitamin B_{12} or a purified liver fraction Ⅸ. プロミン貧血に対する葉酸の効果及び葉酸と肝精製物或いはビタミン B_{12} との併用効果	Ibid., **19** (5) : 653～656 (1953)
TOMIYAMA, T., YONE, Y.	A new chick growth promoting factor in liver	Proc. Japan Acad., **29** (4) : 178～182 (1953)
KATAYAMA, T., TOMIYAMA, T.	The change in ascorbic acid content of *Porphyra tenera* due to ecological and processing conditions	J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **9** (3) : 275～281 (1950)
KATAYAMA, T., TOMIYAMA, T.	A study on a new acidic compound isolated from volatile portion of a green alga, *Ulva pertusa*	Ibid., **9** (3) : 271～274 (1950)
KATAYAMA, T., TOMIYAMA, T.	Chemical studies on volatile constituents of sea weed I. The fractionation of the volatile constituents of *Ulva pertusa* K. 海藻の揮発成分に関する化学的研究 I. アナアオサ（*Ulva pertusa*）の揮発成分の分劃	Bull. Japan. Soc. Sci.Fisheries, **17** (5) : 122～127 (1952)
TOMIYAMA, T., YONE, Y., IDE, K.	Studies on method of estimating freshness of fish I. Estimation of freshness by determining the catalase activity of the gill 魚類の鮮度測定法に関する研究 I. 鰓のカタラーゼ作用力による魚類の鮮度測定	Ibid., **16** (12) : 17～21 (1951)
TOMIYAMA, T., YONE, Y., IDE, K.	II. The relation between the freshness of the flesh and the catalase activity of the gill determined by the manometric method Ⅱ. 検圧法による鰓のカタラーゼ作用力測定値と鮮度との関係	Ibid., **16** (12) : 22～24 (1951)

Tomiyama, T., Ide, K., Akiyama, T.	Studies on the method for testing the spoilage of foods III. A new steam-distilling method for the determination of volatile base in fish flesh 食品の鮮度測定法に関する研究 Ⅲ. 魚肉の揮発性塩基の水蒸気蒸溜による一新定量法	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **17** (7) : 191～196 (1952)
Tomiyama, T., Harada, Y.	IV. A rapid vaccum-distilling method for the determination of volatile base Ⅳ. 揮発性塩基の高温減圧蒸溜による迅速定量法	Ibid., **18** (3) : 112～116 (1952)
Tomiyama, T.	V. A study on the aeration method for the determination of volatile base Ⅴ. 揮発性塩基の通気定量法に関する研究	Ibid., **17** (12) : 405～409 (1952)
Tomiyama, T., Yone, Y.	Studies on methods for determining freshness of foods - VI. A comparative study of methods for determining freshness of "Kamaboko" 食品の鮮度測定法に関する研究 Ⅵ. 蒲鉾の鮮度測定法に関する比較研究	Ibid., **18** (10) : 521～524 (1953)
Tomiyama, T., Yone, Y., Sugawara, N.	Studies on the method for testing the spoilage of food - VII. A new rapid method for determining freshness of "Kamaboko" 食品の鮮度測定法に関する研究 Ⅶ. 蒲鉾の鮮度の一新簡易測定法	Ibid., **19** (4) : 551～554 (1953)
Ishio, S., Tomiyama, T.	On the addition reaction between β-elaeostearine and quinone β-Elaeostearine と Quinone との附加反応について	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **13** (1～4) : 313～322 (1951)
Tachino, S.	Studies on the islets of Langerhans of fishes as a source of insulin I. Biological observations on the islets of Langerhans of fishes インシュリン資源としての魚類ランゲルハンス氏島に関する研究 Ⅰ. 魚類ランゲルハンス氏島の生物学的観察	Ibid., **14** (2) : 265～270 (1953)
Tachino, S.	II. Insulin content in the islets of Langerhans of fishes Ⅱ. 魚類ランゲルハンス氏島のインシュリン含有量について	Ibid., **14** (2) : 271～274 (1953)

TACHINO, S.	III. The effect of the degradation of fish-body on the islet of Langerhans. Ⅲ．魚体の鮮度低下がランゲルハンス氏島に及ぼす影響	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **14** (2): 275～278 (1953)
TACHINO, S.	Studies on the insulin of fishes I. On the extraction of insulin from fishes. 魚類インシュリンの研究 Ⅰ．インシュリンの抽出について	Ibid., **14** (4) : 571～579 (1954)
TACHINO, S.	II. On the purification of insulin. Ⅱ．インシュリンの精製について	Ibid., **14** (4) : 581～587 (1954)
KITAMIKADO, M., TANAKA, H.	Studies on the prevention of emulsifing in alkali-digestion process アルカリ消化採油時におけるエマルジョン形成の防止	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **19** (12) : 1219～1222 (1954)
KITAMIKADO, M., TANAKA, H.	On the removing of free fatty acids of liver oil. 肝油の脱酸に就て	Ibid., **19** (12) : 1223～1225 (1954)
ZENITANI, B.	A new system of classification of the genus *Debaryomyces* based on acid production	J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **10** (2) : 185～198 (1953)
ZENITANI, B.	Yeasts occurring in fishery fermentation products IV. A taxonomic study of true yeasts 水産醗酵食品の酵母に関する研究 Ⅳ．真正酵母菌の分類学的位置に就て	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **14** (2): 301～308(1953)
ZENITANI, B.	V. On the morphological characteristics of asporogenous yeasts. Ⅴ．無胞子酵母菌の形態学的特徴に就て	Ibid., **14** (4) : 589～594(1954)
TOMIYASU, Y., ZENITANI, B.	On gaseous fermentation in "Uni-shiokara". 雲丹塩辛の異常醗酵に就て	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **19** (4) : 585～588 (1953)
TOMIYASU, Y., TOYOMIZU, M.	Studies on the antibiotic action of fish components III. The antibiotic action of methyl esters of unsaturated fatty acids 魚体成分の抗菌作用に関する研究 Ⅲ．不飽和脂肪酸メチルエステルの抗菌作用	Ibid., **18** (12): 683～686 (1953)

Tomiyasu, Y., Toyomizu, M.	V. Influence of the ingredients of the medium on the production of the antibiotic action Ⅴ. 塩類添加によるイカ肝油の抗菌作用出現に対する培地組成の影響に就て	Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, **19** (9) : 963～967 (1954)
Tomiyasu, Y., Toyomizu, M., Takahashi, K.	VI. Production of the antibiotic action by the oxidation of fish oils Ⅵ. 魚油の酸化による抗菌作用の出現	Ibid., **18** (10) : 530～535 (1953)
Tomiyasu, Y., Toyomizu, M.	On the preservation test of fish net by antibiotic fish oils 抗菌性魚油による漁網の防腐試験（予報）	Ibid., **19** (4) : 474～475 (1953)
Miyake, M.	Studies on the mechanism of the opening and closing movement of bivalves I. On the hinge axis 二枚貝の開閉殻運動に関する力学的考察 Ⅰ. 蝶番軸に就て	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **12** (2) :155～164(1951)
Miyake, M.	II. On the iso-elongative line of fibres of adductor muscles Ⅱ. 閉殻筋の等伸度線に就て	Ibid., **12** (2) : 165～175 (1951)
Miyake, M.	III. On the position of the adductor muscle of *Ostrea denselamellosa* Lischke Ⅲ. イタボガキ閉殻筋の位置に就て	Ibid., **12** (3) : 255～258 (1952)
Miyake, M.	IV. On the position on which the resultant of adductor muscles acts Ⅳ. 閉殻筋合力の作用点について	Ibid.,**12** (3) : 259～262 (1952)
Miyake, M.	Mechanism of shell-opening of bivalves by heating 二枚貝の加熱による開殻機構	Ibid., **14** (2) : 279～283 (1953)
Miyake, M.	Physiological studies on the shell movements of bivalves I. Effect of temperature 二枚貝の開閉殻運動に関する生理学的研究 Ⅰ. 温度の影響（その１）	Ibid., **14** (2) : 285～295 (1953)
Miyake, M.	II. Behaviour of shell-fish to ethyl alcohol. Ⅱ. エチルアルコールに対する反応	Ibid., **14** (2) : 297～300 (1953)
Tomiyama, T,, Omachi, T.	Studies on micro-chemical methods for water analysis IX. A micro-method for the determination of hardness of water 水の微量分析法に関する研究 Ⅸ. 水の硬度の微量定量法	Ibid., **15** (10) : 573～576(1950)

TOMIYAMA, T., HOSOKAWA, E.	X. A nephelometric determination of chloride in water X. 塩素イオンの比濁定量法	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **15** (10): 577～581(1950)
TOMIYAMA, T., HOSOKAWA, E.	XI. A nephelometric method for the determination of sulfate XI. 硫酸塩の比濁定量法	Ibid., **15** (10) : 582～585 (1950)
TOMIYAMA, T., HOSOKAWA, E.	XII. A nephelometric method for the determination of calcium XII. カルシウムの比濁定量法	Ibid., **15** (10) : 586～590 (1950)
TOMIYAMA, T., YABUKI, T., ISHIO, S.	XIII. A method for the determination of pH of fresh water having a small buffer capacity XIII. 緩衝価の小さい陸水の pH 測定法	Ibid., **15** (11) : 681～688 (1950)
TOMIYAMA, T., KANZAKI, K.	A semi-micro method for determination of sulfide contained in muddy deposits 底土に含まれる硫化物の少量定量法	Ibid., **17** (5) : 115～121 (1952)
KAWABE, K., TOMIYAMA, T.	Studies on purification of industrial waste I. Detoxication of alkali pulp waste by an acid treatment 工場廃水の浄化方法に関する研究 I. 酸添加処理によるアルカリパルプ廃液の除毒方法	Ibid., **20** (8) : 700～704 (1954)
KAWABE, K., TOMIYAMA, T.	II. A pilot experiment for the treatment of alkali pulp-waste liquor II. アルカリパルプ廃液浄化の中間工業試験	Ibid., **20** (8) : 705～708 (1954)

—— Fishery Research Laboratory ——

SEGAWA, S., OHTA, K.	Notes on some seaweeds of Hakata Bay 博多湾の海藻についての二三知見	Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., **13** (1～4) : 282～285 (1951)
TOMIYASU, Y., TOYOMIZU, M., TAKAHASHI, K.	A method of freshness determination of aquatic food products 水産食品の一鮮度測定法	Ibid., **12** (4) :391～398 (1952)
TANAKA, O.	The pelagic copepods of the Izu region	Records Oceanogr. Works Japan, **1** (1) :126～137(1953)
TANAKA, O.	Note on *Calanus tonsus* BRADY in Japanese waters	J. Oceanogr. Soc. Japan, **10** (1) : 29～39 (1954)

濱名湖に於ける牡蠣の斃死と底土中の硫化物含量との關係

清石禮造　富山哲夫

日本海洋學會誌　第1卷第1,2號別刷

(昭和17年5月15日發行)

濱名湖に於ける牡蠣の斃死と底土中の硫化物含量との關係[*1)]

清石禮造[*2)]・富山哲夫[*3)]

1. 緒　言

濱名湖に於て簡易垂下式により增殖せる牡蠣は其年產額約 35 萬圓（100 萬連）にも達する重要なる水產食糧資源であるが，從來夏季より秋季にかけて多數斃死したる慘害が屢〻報ぜられ，牡蠣增殖に對する不安を釀成して居る．昭和 9 年以後に於ける斃死原因と思はれるもの及び斃死區域を擧げると次の如くである．

(1)　底土の惡變によると考へられる斃死[1)]：湖東部（昭和 9 年 8 月）・湖奥部（昭和 12 年 8～9 月）．(2)　渦蟲類 (Stylochus sp.) の大發生に原因する喰害斃死[2)]：湖東部（昭和 13 年 10 月）；猪鼻湖の一部（昭和 14 年 10 月）．洪水による表層水の淡水化に原因する斃死[3)]：湖奥部全體（昭和 13 年 6～7 月）．

之等の內で (2) 及び (3) は特殊なる條件に於て見らるゝものであるから，之等による斃死が今後屢〻發生する可能性は寧ろ尠いと考へられる．然し (1) の原因による斃死は濱名湖の富榮養化が進むと共に頻發する機會も多い理である．本研究の對稱である昭和 14 年 8～9 月の湖奥部及び湖東部に於ける夥しい斃死も以下に詳報する如く底土の惡變に基くものであつた．この時の牡蠣の斃死は湖內の垂下牡蠣の 1/3（約 30 萬連）に及び，特に灣奥部の養蠣業者には無收穫のものが多かつた程の慘害であつた．夫故に濱名湖の牡蠣生產力を高揚する爲には先づその底土の生化學的狀態或は其改良に就て最も注目さるべきであり，又この方面の研究により牡蠣斃死の豫防對策が考慮さるべきである．

濱名湖の底土に關しては主としてその硫化物含量に就て行はれた吉村・和田兩氏[4)]の興味ある豫察的研究がある．之によると濱名湖の水理狀態は深度と共に著るしく異り，底質は 0～4 m と 4～16 m との二區に大別される．卽ち 0～4 m 區域に於ける底質は砂質乃至砂質骸泥，其硫化物含量は 0.4～0.5‰ であつて大形の底棲動物が棲息して居るに反し，4～16 m の湖北區域に於ける底質は黑色腐泥，其硫化物含量は 4～10‰ に達し，大形底棲動物が棲息し得ない無生物地區をなして居た．

然るに本湖に於ける養蠣場は水深約 2～3 m の範圍にあり，上記の研究によると前者に屬すべき筈であるが，屢〻牡蠣の斃死が突發して居る．この斃死は將して養蠣場の底質自身の惡化によるか

---

*1) On the Unusual Death of the Oyster in Relation to the Sulfide-Contents in the Bottom Deposits of the Brackish Water Lake Hamanako, Sizuoka Prefecture By Reizo Seisi and Tomiyama Tetuo. 九州帝大農學部水產學敎室報文第 2 號

*2) 滋賀縣水產試驗場　*3) 九州帝大農學部水產化學敎室

或は湖心部の底層を充して居る惡水塊の移動によるものか，更に又豫防對策を如何にすべきか等を明かにする目的を以て，著者等は昭和 14 年 8～9 月の甚大なる牡蠣の斃死を見たる直後（9～10 月）に主として養蠣場附近の底層水の酸素，*pH*，竝に底土の硫化物，硫化水素の定量を行つた．主湖盆底土の分析結果は吉村・和田兩氏の結果と近似して居るが，灣入部沿岸に於ける結果は全く趣を異にし，2～3 *m* の淺所に於てさへ 1‰ 以上にも達する多量の硫化物を含有するのが一般であり，一部の養蠣場には湖心部底土の硫化物含量を凌駕する程の腐泥も存在して居た．之等の硫化物含量竝に有機物含量は牡蠣の斃死率と密接なる相關を示して居る事，及び主湖盆の底層にある多量の硫化物を含む惡水が風力攪亂によつても到達し得ない灣入部に斃死が多い事より考へ，本調査時の牡蠣斃死原因は養蠣場附近に於て發生する硫化水素の毒作用に因るものである事を明かにした．

上記の如き原因に基く水產資源生產力の減耗は本邦の他の地方に於ても屢々起るものであり[5]，沿岸增殖上緊要なる問題である．斯かる區域を積極的にトラクター或はドレツヂ樣の機械により反轉酸化を行つて斯かる斃死を未然に防止すると共に，底土の含む榮養成分を水界の天然餌料に補給して增產を計り，或は又同樣の原因により荒廢せる漁場を更新する等の計劃に對し，本研究はその基礎をなすものと思惟されるので，玆に結果の概要を報告する．

本研究を實施するに當り絕大なる御援助と御注意とを與へられたる靜岡縣水產試驗場濱名湖分場長稻葉俊技師に深謝の意を表する．又試料の採集と分析の一部とは西野隆，望月喜平兩君に負ふ處が多い，記して御助力を謝す．又本研究の一部は文部省科學研究費の補助により遂行した，玆に深謝する次第である．

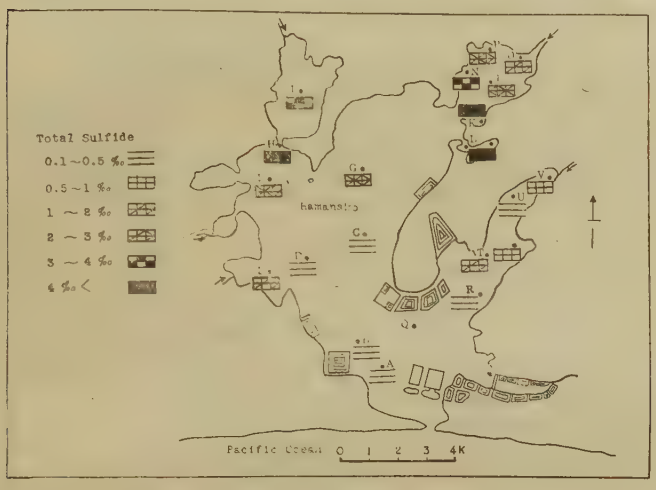
2. 研究方法及び觀測點

採水には北原式 B 號採水器を用ひ，採泥には Ekman-Birge 式採泥器を以てした．採取した底土は直ちに其溫度を測定したる後，200 *cc* 容の廣口瓶に充し，尙底層水を加へて空氣を完全に排除し，翌日の定量迄冷藏庫に貯藏し，以て變化を可及的に防いだ．

湖水の分析は常法[6]に從ひ，底土の硫化水素及び硫化物の定量は富山・神崎の微量法によつた.* 卽ち 0.200～1.00 *g* の供試濕泥をミクロ窒素蒸溜器により，遊離硫化水素の場合は直ちに水蒸氣蒸溜し，全硫化物の場合には 2 *cc* 10% HCl を加へて後蒸溜を，5～8 分間續ける．蒸溜液は 5 *cc* 飽和醋酸亞鉛中に捕集し，生成せる硫化亞鉛に一定量の沃度液及び 2 *cc* 10% HCl を加へ，殘存する沃度を逆滴定し，消費沃度量より H_2S を計算し，別に水分を定量して乾物泥 1 *kg* 中の H_2S の瓦數卽ち ‰ を以て現はした．底土の有機物量の概數を求めるには乾泥の灼熱減量を以てした．この方

* 泥土中の硫化水素量は泥の pH により支配されるから，之を正しく定量する方法は未だない．富山・神崎法による硫化水素の値もこの意味に於て近似値である點は分析結果の檢討に當り注意を要する．

法による有機物量は炭酸鹽の分解により過多となり又低原子價の鐵，マンガンの酸化により過少となる缺點があるが，簡單の爲にこの方法によつた．泥土の *pH* 測定は供試泥保存瓶の上澄水の *pH* を比色法にて測定する方法に依つた．然し一般に泥土の *pH* は採泥の時に混入する上層水の *pH* に影響され，特に深所の泥の *pH* 値にはこの誤差が多く含まれる．

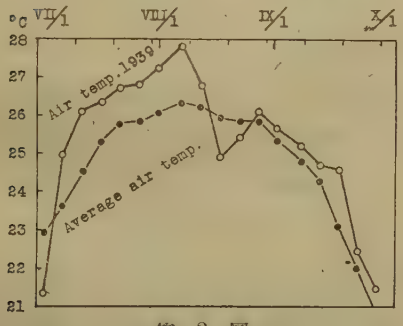


第 1 圖　調査地點及び底土中の硫化物の分布

牡蠣の斃死率は 2～5 連の觀察の平均をとることとした．觀測點としては第 1 圖に示せる如き 22 點を選んだ．

3. 濱名湖底土の硫化水素，硫化物及び有機物含量と牡蠣斃死率との關係

昭和 14 年夏季は例年より氣溫高く(第 2 圖)，又降雨量も異常に尠かつた．牡蠣の斃死を見た 8 月下旬より 9 月上旬に於ける湖心部上層の水溫は第 1 表の如く 27～29° であつたので，養蠣場のある瀕岸部は恐らくそれ以上に昇つたものと想像される．これが底土の腐敗を異常に促進し斃死を招いた第一義的原因と見られる．一般に水溫が最も高い 8～9 月頃に於て，無風狀態で且强烈な日射が續く時に牡蠣の斃死が起る事からも明かである．かゝる條件に於ては泥土の細菌は活潑に有機物を分解し，泥土中の酸素は勿論，底層水の酸素をも消費し盡し，更に泥土中の硫酸根の酸素をも利用する爲に猛毒なる硫化水素を副成し同時に CO, CO_2 の如き毒物をも生成するので，之等が水中に擴散して生物の生存を制約するものと考へられる．

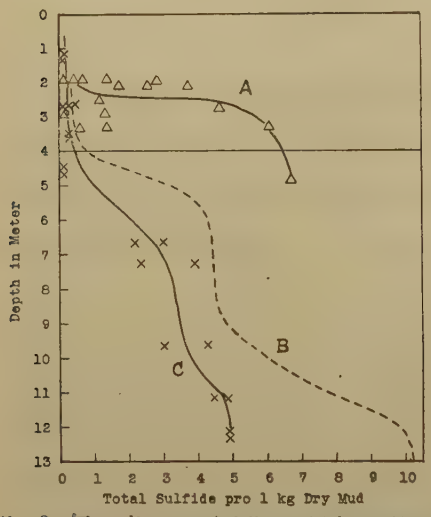


第 2 圖
昭和 14 年夏季氣溫と平均氣溫との比較

他方，湖心部 (St. G) に於ける湖水の惡變と水溫との關係を見るに，第 1 表に明かなる如く，9 月 4 日には 9 *m* 層以下が無酸素狀態であり，硫化物は 10 *m* 層より檢出されるに對し，10 月 3 日には旣に水溫が低下し始めたに關らず 5 *m* 層以下が無酸素層となり，硫化物は 8 *m* 層より檢出された．卽ち水質の惡變は寧ろ放熱期にある 10 月の方が顯著であつて，この狀態は斃死の時期とは一致して居ないのが判る．しかも主湖盆の惡變水が風力による攪亂によつて到達し得ないと思

第 1 表 湖心部(G 點)の水質の垂直的變化

Depth in meter	Water temp. °C			pH			Salinity δ_{15}			Oxygen cc/l			H_2S mg/l			Air temp. °C		
	Sept. 4	Oct. 3	Oct. 30	Sept. 4	Oct. 3	Oct. 30	Sept. 4	Oct. 3	Oct. 30	Sept. 4	Oct. 3	Oct. 30	Sept. 4	Oct. 3	Oct. 30	Sept. 4	Oct. 3	Oct. 30
0	27.9	23.7	19.8	8.3	8.5	8.3	13.82	13.88	12.91	5.84	5.55	7.17				27.7	21.7	23.0
1	28.0	22.9	19.6	8.3	8.5	8.3	——	13.43	14.40	5.74	5.63	7.55				Transparency		
2	28.0	22.8	19.5	8.3	8.5	8.3	——	13.70	14.34	5.76	5.54	7.11						
3	27.8	22.8	19.5	8.3	8.5	8.3	——	13.85	14.42	5.83	5.54	6.12				Sept. 4	Oct. 3	Oct. 30
4	27.7	23.0	19.4	8.3	8.5	8.3	——	14.05	13.96	6.88	6.75	5.71				4.8m	——	2.1m
5	27.8	23.3	21.2	8.3	8.3	7.5	——	14.57	15.98	5.66	6.51	1.01						
6	27.6	23.5	22.5	8.3	8.3	7.5	——	15.59	17.44	4.96	3.41	0.11						
7	27.2	24.4	22.6	7.9	8.1	7.7	——	16.76	18.25	3.44	1.50	0.00	0.00	0.00	0.28			
8	27.5	25.1	22.4	8.1	7.7	7.7	16.76	17.19	17.89	4.47	0.00	0.00	0.00	1.60	0.55			
9	27.6	25.4	22.0	8.3	7.7	7.5	15.82	18.18	18.60	5.61	0.00	0.00	0.00	2.27	0.00			
10	25.4	25.3	21.4	7.7	7.7	7.5	18.38	18.65	20.51	0.00	0.00	0.00	1.11	3.03	0.00			
11.2 bottom	25.5	24.6	21.4	7.9	7.7	7.5	17.97	19.66	19.75	0.00	0.00	0.00	2.02	3.11	0.59			



第 3 圖 底土の全硫化物量と深度との關係
A: Total sulfide-depth curve for the littoral region. Sept. and Oct., 1939.
B: Total sulfide-depth curve for the main basin. Nov., 1937, Yoshimura and Wada.
C: Total sulfide-depth curve for the main basin. Sept. and Oct., 1939.

はれる灣入部及び湖東部 (St. L, M, K, T, S) の淺所にも牡蠣の斃死が起る點を併せ考へると，斃死の主因は主湖盆に於ける惡變水の移動によるものでなく，養蠣場附近の泥土の惡變に基くとするのが妥當である．

前記の 22 地點に就て昭和 14 年 9 月より 10 月に亙り著者等の研究調査したる水質，底質及び牡蠣斃死率の詳細は第 2 表に示せる如くであつた．本研究の結果を昭和 12 年 8 月に實施せる吉村・和田兩氏の調査結果と比較すると，可成りの相違が認められる．昭和 14 年秋季 (10 月 30 日) には既に秋冬期の北西の季節風の影響で湖水は幾分攪拌されて居る爲か昭和 12 年 8 月に比し硫化物量が尠かつた.* 又泥土の硫化物に就ても同樣に吉村氏等の調査結果より少量であつた．卽ち主湖盆に於ける泥土の硫化水素及び硫化物量の最大値は St. L に見られ，吉村氏の得たる之等の

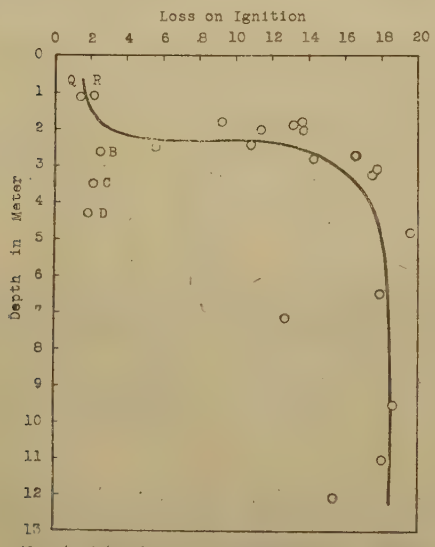
* 例年著るしく發生する紅色硫黄バクテリヤ Chromatium sp. による着色は認められなかつた．
又吉村氏等の定量法は 1 時間に亙り蒸溜せる硫化水素を直接沃度にて捕集するので，其間に沃度の揮發が起ると考へられ，硫化物の結果は過大に出る傾向がある．特に逆流冷却管が充分に作用しない時はこの誤差が著るしい事を著者の一人(富山)は注意した(未發表)．

第 2 表　調査地點に於ける水質，底質及び牡蠣斃死率

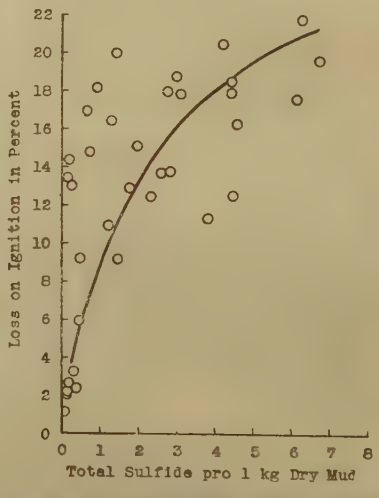
Station	Date	Depth m	Lake Water						Lake Bottom Deposits						Died Oyster %
			Surface temp.	Oxygen Saturation %		pH		Salinity δ_{15}	Property	Temp.	pH	Free H_2S pro Mille Dry Mud	Total Sulfide pro Mille Dry Mud	Loss on ignition	
				Surface	Bottom	Surface	Bottom								
A	Sept. 22	2.5	25.5	105	92	8.5	8.5	18.90	sand	25.5	7.6	0.046	0.333	5.83	0
B	Sept. 22	2.6	26.8	111	94	8.5	8.5	16.50	sandy	26.7	7.5	0.079	0.122	2.30	0
	Oct. 31		19.1	118	116	8.3	8.3	13.07	mud	20.3	7.3	0.046	0.290	3.28	
C	Sept. 22	3.5	26.0	97	57	8.5	8.5	12.11	〃	26.5	7.3	0.038	0.272	2.05	
	Oct. 31		19.5	122	107	8.3	8.3	12.95		19.5	7.3	0.014	0.245	2.19	
D	Sept. 22	4.3	27.1	131	47	8.9	7.9	10.62	〃	26.3	7.5	0.017	0.063	1.83	
	Oct. 31		19.8	123	127	8.3	8.3	13.41		19.9	7.4	0.017	0.060	1.86	
E	Sept. 22	3.2	26.5	132	53	8.3	8.3	11.19	black	27.0	7.1	0.123	0.695	17.7	85
	Oct. 31		19.6	116	127	8.3	8.3	13.96	mud	20.5	7.3	0.072	1.44	20.1	
F	Oct. 3	9.5	23.7			8.5		13.88	〃	24.4	7.5	0.573	3.03	18.8	
	Oct. 30									21.9	7.6	0.449	4.29	20.4	
G	Oct. 3	11.0	23.7			8.5		13.88	〃	24.0	7.4	0.353	2.79	18.0	
	Oct. 30		19.8			8.3		12.91		22.5	7.5	0.555	4.41	18.4	
H	Oct. 5	12.0	22.6			8.5			〃	24.5	7.7	0.966	4.86	15.4	
	Oct. 30									22.5	7.3	0.771	4.84	18.0	
I	Oct. 5	6.5	21.5			8.5		11.68	〃	25.7	7.4	0.359	3.08	17.9	85
	Oct. 30		18.5			8.3		10.08		22.0	7.4	0.363	2.19	18.1	
J	Oct. 13	7.1	22.1			7.9		13.80	〃	24.4	7.7	0.391	2.35	12.3	
	Oct. 30		19.8			8.3		6.12		22.5	7.5	0.555	4.41	12.3	
K	Oct. 13	3.2	23.5			8.1			〃	23.4	7.1	0.655	6.19	17.5	70
L	Oct. 13	4.8	23.5			8.3		14.93	〃	23.8	7.3	0.473	6.76	19.6	45
M	Oct. 13	2.7	23.6			8.3			〃	23.6	7.4	0.790	4.65	16.3	80
N	Oct. 13	2.0	23.5	143	130	8.3	8.3	13.97	〃	23.8	7.5	0.656	3.81	11.3	80
O	Oct. 13	2.4	24.8	136	126	8.3	8.3	13.50	〃	23.9	7.5	0.180	1.26	10.9	50
P	Oct. 13	2.0	23.6	122	117	8.3	8.5	13.07	〃	24.0	7.5	0.222	2.54	13.8	75
	Oct. 30									20.5	7.5	0.351	1.76	12.8	
Q	Sept. 22	1.2	26.1	111	76	8.5	8.3	13.96	sandy mud	26.1	7.4	0.008	0.042	1.49	0
R	Sept. 19	1.1	26.0	113	68	8.5	8.5	18.11	〃		7.0	0.150	0.210	2.25	50
S	Sept. 19	1.8	27.1	92	86	8.5	8.4	16.19	gray	27.6	7.3	0.051	0.407	9.31	55
	Oct. 30		18.4	103	105	8.3	8.3	13.80	mud	19.3		0.101	1.42	9.27	
T	Sept. 19	1.9	26.9	156	114	8.3	8.3	17.34	〃	26.5	7.3	0.077	0.212	13.2	60
	Oct. 30		19.4	90	96	8.3	8.2	17.37		20.0	7.5	0.218	2.83	13.8	
U	Sept. 19	1.8	27.9	103	31	8.4	7.7	16.52	〃	27.2	7.3	0.025	0.048	13.5	100
	Oct. 30		19.3	114	43	8.3	7.9	13.90		21.0	7.2	0.089	0.723	14.9	
V	Sept. 19	2.8	28.8	128	42	8.3	8.3	16.74	〃	27.3	7.2	0.016	0.142	14.42	100
	Oct. 30		18.9	116	56	8.3	7.9	13.47		20.7	7.3	0.097	1.36	16.4	

値を 100 とすると，今回の調査では夫々約 30, 47 に過ぎなかつた．斯く量的の相異はあるが，主湖盆各所に於ける底土の硫化物含量と深度との關係は昭和 12 年の結果と略ゝ一致して居る（第 3 圖）．然るに吉村氏等の調査洩れとなつて居る灣入部或は瀬岸部の 4 m 以淺に於ては硫化物含量は深度と寧ろ無關係と見做され，吉村氏等の結果と全く趣を異にして居る．しかも主湖盆の深部底土の硫化物に劣らない程の多量さへ含む泥土が水深 2～3 m 附近に見られる（第 3 圖 A）．

底土の有機物と深度との關係は第 4 圖に見られる如く硫化物の場合と類似し比較的水の疎通のよい St. B, C, D, Q, R には少量で 4% 以下，水深約 2～3 m の範圍では有機物が急激に增加し 10～19% に達し，3～13 m 範圍は殆ど一定で 16～20% を含有して居る．



第 4 圖 底土の有機物量と深度との關係



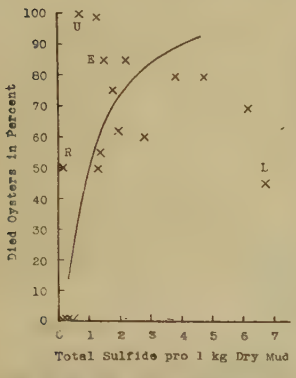
第 5 圖 底土の硫化物量と有機物量との關係

硫化物及び有機物との關係は第 5 圖により明かなる如く，概ね正の相關が認められる．夫故に陸より運ばれた有機物及び繁殖した蜝が先づ堆積し，次で微生物の增殖，硫酸鹽の還元等の階段を經て次に示す如くして硫化物が生成したものであるのは明瞭である．

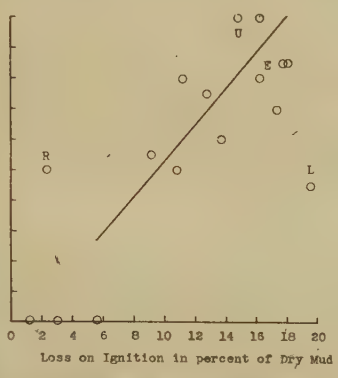
$$\left.\begin{matrix}\text{Detritus}\\ \text{腐植質其他}\\ \text{有機物}\end{matrix}\right\}+O_2 \xrightarrow[\text{bacteria}]{\text{aerobic}} \left.\begin{matrix}CO_2+H_2O\\ \text{其他酸化中間體}\end{matrix}\right\}+SO_4+H_2O \xrightarrow[\text{bacteria}]{\text{anaerobic}} \begin{matrix}CO_2\\ \boxed{H_2S}\end{matrix}$$

斯樣に多量の有機物及び硫化物を含む腐泥が瀬岸部の養蠣場に常に存在する點は牡蠣の斃死と不可分の關係にある筈である．昭和 14 年 8～9 月に於ける牡蠣の斃死率と養蠣場底土の有機物量竝に硫化物量との關係は，第 6 圖及び第 7 圖に見らるゝ如く明かなる相關が認められる．St. R を除くと，有機物を 8% 以上含有する泥土が養蠣場に存在すれば增殖は危險と見做される．又 St. E, U, L, R の例外を除くと一般に全硫化物として泥土中に 1‰ 以上存在すれば牡蠣の生存は危險と

考へて差支へない．嚴密には牡蠣の棲息に不適當なる條件は猛毒なる硫化水素によると考へられるから，全硫化物量により上記の如く決定するのは當を得たものと考へ難いが，後述する如く硫化水素は可溶性硫化物と密接なる關係があり，兩者の量は pH により左右されるから，不溶性硫化物が大部分を占めない限り又底土の pH が著るしく異らない限り，硫化水素は全硫化物と正比例すべきである．實際に本研究の範圍では硫化水素と全硫化物とは第8圖の如く略々正比例する關係を示して居るから，定量誤差の多い硫化水素の代りに全硫化物を以て現はした方が安全である．

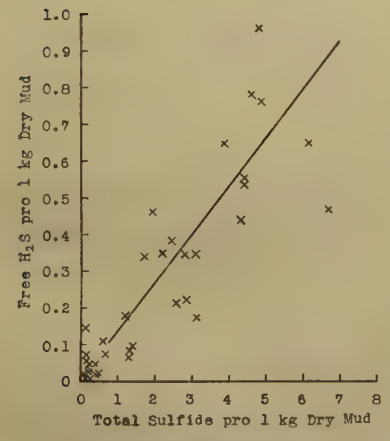


第 6 圖　底土の全硫化物量と牡蠣の斃死率との關係



第 7 圖　底土の有機物量と牡蠣の斃死率との關係

斃死率と底土の硫化物含量との關係に於て例外をなして居る地點に就て檢討するに，St E 及び R の泥土中には夫々 0.7～1.4‰，0.21‰ の硫化物を含むに過ぎないが，之等の泥土の pH は最も低く（pH 7.0～7.1），從て遊離硫化水素量が比較的多い事及び底層水の酸素量が少い事より考へ斃死原因は同樣に硫化水素によるものと考へられる.* 又 St. U 及び V に於ては牡蠣が全滅したに拘らず，泥土中の硫化物が夫々 0.5～0.7‰，0.1～1.4‰ に過ぎなかつたが，更に詳細に檢討するに，之等の兩地點の底土には多量の有機物が含まれ，底層水の酸素飽和度及び pH が低い事より考へると腐敗分解が可成り激しかつた事は明であるから，發生した硫化水素の固定能**がこの地點の泥土に少く逐次水界に擴散したか，或は硫化水素の外に一酸化炭素の如き有毒瓦斯による被害かとも想像される．



第 8 圖　底土の全硫化物と遊離硫化水素との關係

以上の檢討により牡蠣の斃死の直接原因は養蠣場附近に於て發生せる硫化水素による被害である

*) St E, R は採泥した場所が養蠣場から少し離れて居たのと，之等兩場所は潮汐，風向，風力等の關係で一時的に著るしく泥土が惡變し易い爲に他の地點と同一に論じ難い．底土は著るしく多量の有機物を含み，硫化物其他の有毒物發生の好適條件をなして居り，クロダヒ，カレイ，ハゼ等の魚類が斃死した例があり，其時の底土の硫化物は 1‰ に達して居た．

**) 不溶性硫化物を形成する鐵の含量にも支配されるが，同時に土壤の酸性度により變化する．濱名湖一帶は三方ヶ原酸性土壤より成るので一般に硫化水素の固定能は弱いものと考へられる．

事が明かにされたが，pH 7.0～8.3 の範圍にある養蠣場の水及び泥の中にどの程度の硫化水素が存在し得るかは重要なる鍵であるから，次に理論的考察を試み又その實驗的檢證をも行つた．

硫化水素の第一及び第二解離恒數は次の如き値* であるから，泥土の pH が 7.0～7.7 の場合に就て考へると，下式 (1) にこの値を代入して $[HS']/[H_2S]$ の比を求め，全可溶性硫化物*に對する

$$H_2S \rightleftarrows H^{\cdot} + HS' \qquad K_1 = \frac{[H^{\cdot}][HS']}{[H_2S]} = 9.1\times10^{-8} \text{ at } 18°$$

$$pH = 7.04 + \log\frac{[HS']}{[H_2S]} \quad \cdots\cdots(1)$$

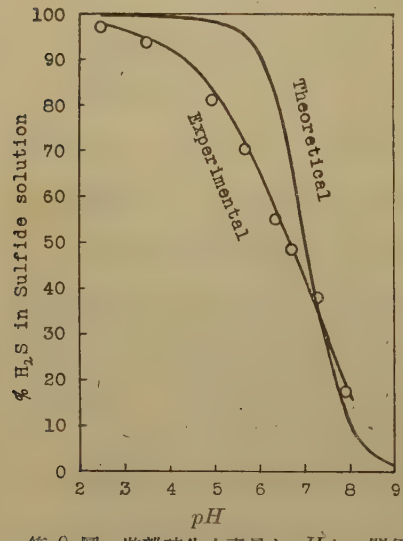
$$HS' \rightleftarrows H^{\cdot} + S'' \qquad K_2 = \frac{[H^{\cdot}][S'']}{[HS']} = 1.2\times10^{-15} \text{ at } 18°$$

$$pH = 14.92 + \log\frac{[S'']}{[HS']} \quad \cdots\cdots(2)$$

割合を略算すると，次の如く 52.2～18% だけが猛毒なる硫化水素として遊離に存在し得る．同樣に pH 8.3 の海水の場合には全可溶性硫化物の 5.2% の遊離硫化水素が理論上存在する筈である．

pH	7.0	7.7	8.3
$\frac{[HS']}{[H_2S]}$	$\frac{0.91}{1.00}$	$\frac{4.56}{1.00}$	$\frac{18.2}{1.00}$
全可溶性硫化物中の H_2S%	52.2	18.0	5.2

次に實驗的に之等理論値を確證する目的を以て次の如き實驗を行つた．先づ硫化ソーダ溶液に指示藥を加へ，0.1n HCl を以て種々の pH に調節したる後，直ちに水素を通じ，約 pH 1 だけづれる迄即ち約 5 分間續け揮發する硫化物を定量して見た．其結果は第9圖に示せる如くで，實驗値は理論値よりも殆ど皆過少であつた．然し一般に水素による硫化水素の完全なる驅逐には約 30 分間を要する點を考慮すれば，5 分間の如き不充分なる通氣に原因する過少値であるから，上記の理論を檢證するには充分なる結果と考へられる．



第 9 圖　遊離硫化水素量と pH との關係

第 9 圖に見られる如く，$\frac{\triangle[H_2S]}{\triangle pH}$ の値は pH の値により著るしく異り，pH 7 附近に於ける pH 値の一定の變化

*)　硫化物は次の如き形にて存在する．

全硫化物 ⟨ 不溶性硫化物……例へば FeS
　　可溶性硫化物…… $\begin{cases} NaHS + H_2O \longrightarrow Na^{\cdot} + OH' + H_2S \\ Ca(HS)_2 + H_2O \longrightarrow Ca^{\cdot\cdot} + OH' + H_2S \end{cases}$
　　遊離硫化水素　　H_2S

は pH 6 以下或は pH 8 以上に於けるそれよりも著るしく硫化水素の存在量を變化せしめる．この關係は次式により明瞭であり，$\frac{\triangle[H_2S]}{\triangle pH}$ の最大値は pH 7.03 にあるのが判る．

$$K_1=\frac{[H^{\bullet}][HS^{\prime}]}{[H_2S]}=\frac{[H^{\bullet}][1-H_2S]}{[H_2S]}$$

從て　$$[H_2S]=\frac{[H^{\bullet}]}{K_1+[H^{\bullet}]}=\frac{10^{-pH}}{K_1+10^{-pH}}$$

$$\frac{d[H_2S]}{dpH}=\frac{-K_1\times 10^{-pH}}{(K_1+10^{-pH})^2}$$

$$\frac{d^2[H_2S]}{dpH^2}=\frac{K_1\times 10^{-pH}(K_1-10^{-pH})}{(K_1+10^{-pH})^3}$$

曲線の彎曲點は $\frac{d^2[H_2S]}{dpH^2}=0$ の點，即ち $pK_1=pH$，換言すれば pH 7.03 の點であつて，この附近に於ては pH の一定變化に對する $[H_2S]$ の變化量は最大である．

以上の檢討によつて pH 7 より大なる微アルカリ性の底土及び海水に於ても常に硫化水素が平衡狀態に存在する事，又 pH 7 附近に於ける pH 値の一定變異は他の pH 範圍に於ける一定變異よりも硫化水素の存在量を著るしく左右する事も解明された．

他方，硫化水素の毒性は猛烈であつて鯉に對する試驗によると,* 0.5 mg/l H_2S の存在では約 30 時間で斃死する．夫故に遊離硫化水素による中毒は pH 7.7～8.3 附近の養蠣場の水中に於ても起る事が了解出來る．

4. 牡蠣斃死に對する防止對策

一般に養蠣場は入江或は內灣にあるから榮養度高く，天然餌料の豐富なる事及び風波の難の少き事等の有利なる條件を有するが，他方又前記の如き惡條件をも形成し易い要因をも包含して居る．この惡化せしめる根本的要因に就て考察すると，(1) 淺所である爲に泥溫が上昇する事，(2) 富榮養化せる地域であるから有機質が堆積し腐敗狀態に向ふ事，(3) 牡蠣を垂下する爲に潮流を妨げ泥土の酸化を不完全となす事等である．

翻て濱名湖の養蠣場に於ける上述の如き惡變化を未然に防ぐ爲には大體次の如き豫防と應急の對策が考へられる．

先づ豫防對策としては冬期或は初春の酸素量多量なる時に養蠣場の腐敗泥土をドレツヂ樣の機械により反轉し，酸化を行ふのが最良策と信ぜられる．この方法によると分解汚泥に含まれたる窒素，燐酸等の榮養成分が水層に供給され天然餌料の增生に役立ち，牡蠣，海苔其他水產資源の增產に有效に利用される．

次に應急策としては次の如き措置が考へられ，且昭和 15 年夏當業者の一部には之を實施の結果

*) 著者の一人(富山)の流水式試驗の結果で近く發表の豫定である．

斃死を免れたものがあつた．即ち夏期水溫の最も上昇する 8 月より 9 月上旬の期間天候其他に就て常に注意を拂ひ，氣溫が高く雨量が少い場合には，直ちに其場所の泥土の狀況を檢する，泥土の惡變を知るには硫化物及び硫化水素を定量するのが最もよいが，簡單の爲には泥土の硫化水素臭，色調又び pH を檢するのが有效である．もし惡變を知つた場合には(1)速に牡蠣を安全なる場所に移轉避難するか，(2) 垂下連をなるべく水面近くに横へて結びつける．(2) の對策は表層に酸素が多い爲に多量の硫化物は存在し得ない事を利用したもので，實際に下層程牡蠣の斃死が多く，上層は殆ど斃死しないか或は下層に比し非常に被害が少いからである．

5. 總　　括

1. 濱名湖の牡蠣の夥しい斃死が起つた昭和 14 年 8～9 月直後及び 10 月に於ける養蠣場竝に主湖盆の底層水及び底土の化學的研究を行つた．

2. 養蠣場に於ける底土の硫化物及び硫化水素含量は一般に 1‰ 以上のものが多い．

3. 主湖盆に於ては硫化物硫化水素及び有機物の含量は深度と密接なる關係があるが，養蠣場に於ては兩者は殆ど無關係の如くである．

4. 底土の全硫化物と遊離硫化水素とは正比例する．

5. 底土の硫化物量と有機物量とには正の相關がある．

6. 牡蠣の斃死率は斃死現場の底土の硫化物竝に有機物含量と正比例する．硫化物 1‰ 以上或は有機物 8% 以上を含む底土が存在する養蠣場は牡蠣の棲息に危險の樣である．

7. 斃死原因は硫化物を多量に含む主湖盆の底層水が移動したる爲ではなく，養蠣場の底土より發生せる硫化水素によるものと考察した．

8. 海水に存在し得る遊離硫化水素の量に就て理論的考察竝に實驗的檢證を行つた．

9. 牡蠣斃死の豫防竝に應急對策に關し檢討を行つた．

文　　獻

(1) 靜岡縣水產試驗場事業報告 **31, 32** (1934～35).
(2) 清石禮造 1938: 濱名湖の牡蠣を喰害したヒラムシ (Stylochus sp.) に就いて．靜岡水產時報.
(3) 清石禮造 1938: 豪雨の被害大なりし濱名湖の養蠣．靜岡水產月報. **53.**
(4) 吉村信吉・和田憲夫 1938: 湖底堆積物特に汽水湖の湖底堆積中に含まれる硫化水素竝に硫化物の豫察的研究．陸水雜, **8**, 2.
(5) 川名武 1936: 三方湖群の異常現象に就きて I, II, III. 水產研究誌, **31.**
(6) 海洋氣象臺 1936: 海洋觀測法.
(7) 富山哲夫・神崎瑞夫: 日本農藝化學會誌に近く發表.
(8) Landolt-Börnsteins Physiko-Chemische Tabellen III Erg. Bd., s. 2102.
(9) 清水光夫・倉茂英次郎 1933: 佐鳴湖に於ける魚類斃死の原因に就きて．氣象集誌. **12**, 3.
(10) Yoshimura, S. and Wada, T. 1938: Hydrogen sulfide in the bottom deposits of the brackish water, Lake Hamanako, Sizuoka Prefecture. Proc. Imp. Acad., **14**, 114～119.

佐鳴湖の惡變現象に就て

清石禮造，稻葉　俊，富山哲夫

陸水學雜誌・第11卷・第4號 (pp. 137—145)
昭和17年5月發行　別刷

佐鳴湖の惡變現象に就て

清石禮造　稻葉　俊　富山哲夫*)

(滋賀縣水產試驗場)　(靜岡縣水試濱名湖分場)　(九州帝大農學部)

On the limnological change unfavorable for the fauna and flora of Sanaruko, Sizuoka Prefecture.

By R. Seishi, S. Inaba and T. Tomiyama.

緒　言

佐鳴湖は往時濱名湖の灣入部であつたが (13), 現在は殆んど獨立した小鹽水湖にして, 三方ケ原丘陵の南端に位し, 且濱松市に接近して居る。湖の大さは面積凡そ 100 エーカー, 周圍 9 km, 水深約 2 m である (第 1 圖)[1]。往時は現在よりも遙かに貧榮養湖であつた爲, 湖水に對し有機物其の他の榮養物質の施肥が魚族蕃殖を目的として屢々行はれて居たが (9), 近年に於ては三方ケ原の開墾, 湖水附近に養魚池の構築等々に因り著しく湖水は富榮養化し, 最近の昭和年代に於ける 1 町步當りの生產高は 100 貫以上に達して居る。棲息魚類の內重要なるものは鰕, 鰻, 公魚, 鯉及び鮒 (生產高順) である。

本湖水は現在迄に數氏により調査され (1, 2, 10), 就中其の異常水質に關しては淸水, 倉茂兩氏により研究されて居る。兩氏の研究せる昭和 8 年 8 月 30～31 日の惡變現象に於ては本湖の主要魚族の大多數は斃死し, 其の總量は 10000 貫にも達した。當時の調査研究によれば水質の惡變は藍藻類 (*Clathrocystis aeruginosa* Henfrey) の枯死に因るものとされ, 表層水迄殆ど無酸素狀態となり而も底層には可成りの硫化水素 (H_2S 2.83 mg/l)[2] が檢出されて居る。斯樣に藍藻類も急激に枯死せしめた原因に就ては當時の氣象狀況特に水

---

*) 九州帝國大學農學部水產學教室報文第 3 號。

1) 稻葉等の調査によれば湖の長軸に沿ふて南北兩側の周邊部が約 20 cm 程深くなつて居る (2)。(附圖參照)

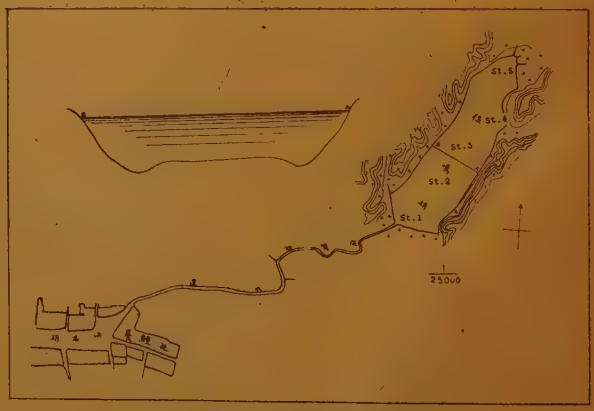
2) 沃度法で定量されて居る故に實際は有機物及び硫化物の影響も考へられる。

溫の異常な上昇による以外には何等明らかに論斷されて居ない。今回筆者等が調査した時の狀態は昭和 8 年の惡變現象と殆ど同樣な狀態と推定されるも，湖魚が斃死する程顯著ではなかつた。然し本湖水が惡變現象を呈する前後の狀況を稍々詳細に調査し得たをるを以て此處に報告する次第である。本研究調査を施行するに當り熱心なる助力を致された，靜岡縣水產試驗場濱名湖分場の元助手藤田憲二，山下市重，西野隆，望月喜平の四氏に對して深謝の意を表する。

調査時期及び研究方法

調査は昭和 13 年 2 月より昭和 15 年 3 月迄前後 7 回行ひ，其の詳細は第 1 表に示す如くである。調査は每回とも濱名湖の主湖より佐鳴湖水道を溯つて行つたが，干潮時には水道が淺くて航行は相當困難であつた。

湖水の分析は常法 (5) に據つた。底棲生物の調査には EKMAN-BIRGE の採泥器を用ひて採泥し，肉眼的大型底棲生物を計數して後，直ちに 5% のホルマリン液に貯へた。それ故第 1 表に示す底棲生物の重量は（シジミ *Corbicula japonica* を除く）すべてホルマリン重量である。採水並に採泥地點は第 1 圖に示す如く 5 個所にして底棲生物の採集は採泥の不滿足なものを除いて 1 個所を必ず 5 回行つた。泥土の分析材料としては，



第 1 圖　佐鳴湖の調査地點

採泥後直ちに 200 cc 容の廣口瓶に泥土を詰め，底水を以て溢れさせ密栓して後，湖水を滿したる容器に貯藏して暗所に置き，出來る丈け現場の狀態を其の儘實驗する迄保存する樣に努めた。硫化物の定量 (14) には以上の狀態にして實驗室に運んだ試料（生泥の重量で 2.0～3.0 g）を用ひた。泥の pH と

しては懸濁液の pH を測定する方法によらずして廣口瓶の上方に溜つた水の pH をフエノールレツドを指示藥として比色測定した値を以て示したので正確とは言ひ難い。

湖の一般的性狀

水溫は夏季日射の烈しい時では 30°C 以にも上昇し，冬季には 4°C 以下に降ることは殆どない。鹽分は 1～3 gCl/*l* の間にあり，季節或は年により一定しない。榮養物質は多量にして夏季は植物プランクトンの繁殖による“水の華”を生じ，透明度は最大 1.5 m を超えない。溶存酸素は湖が淺いので風波による攪亂が烈しく從て平常は下層迄飽和されて居るが（第 1 表），湖水の惡變を呈した場合には下層は無酸素狀態となることが想像される。

底棲生物は湖水の狀態が正常なる場合には豐富にして富榮養性の搖蚊幼蟲，主として *Chironomus plumosus* の體長 10～17 mm のものが湖底の殆ど全區域に見出され，其の量は 1 m² 當り平均 1136 個體であつた。之に反し，湖が惡條件に變移した時は之等多數の搖蚊幼蟲は殆ど全部死滅して僅かに瀨岸部の湖水循環の良好な個所にのみ小數棲息せることが認められた。底棲生物として其の他に採集されたものは Tubificidae に屬する數種（*Tubifex, Limnodrilus, Branchyura,* etc.）があり，外に St. 1 で常に僅かながら *Corbicula japonica* が採集されたが，搖蚊幼蟲以外の之等の大型底棲生物の棲息密度は周年殆ど變化して居ない。尙昭和 15 年の冬季の調査に於ては瀨岸部 (St. 1,5) に Tanypinae 幼蟲が僅かに採集された。之等によると本湖水の底棲生物は *Chironomus plumosus* を以て代表され，宮地博士 (8) の本邦湖沼の底棲生物による分類標式によれば，中榮養性オホユスリ蚊亞型乃至は多榮養性オホユスリ蚊亞型に屬すると言ひ得る。

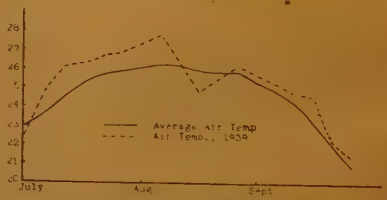
底質は殆んど微細な粘土に覆はれて居るが (11)，注排水部 St. 1,5 の底質は砂泥である。泥土の呈色は一般に黑灰色であり，湖水の狀態或は季節によつて灰色或は黑色の何れかが勝つて居た。いづれの場合でも常に可成り强い硫化水素臭を有して居た。冬季は湖水の循環と風波による攪亂で泥土の表面は褐色の“酸化泥”に覆はれて居た。底土は有機物に富み，中央部 St. 3 に

於ける試料の灼熱減量は 15～18% にも達し，又其の全窒素量[1] は 0.45% を示した。泥土の硫化水素及び硫化物は湖水の狀態によつて後述する如く顯著なる變化を示す。

湖水の惡變現象[2]

佐鳴湖に於て此の現象の最も烈しかつたのは昭和 8 年 8 月であり亞で昭和 14 年及び 15 年夏である。著者等は昭和 14, 15 年の湖水惡變前後に於ける種々の調査をなし，第 1 及第 2 表の如き結果を得た。其の內特に著しいものに就て比較檢討すれば次の樣である。

i. 氣象の異變 湖水が惡變を起す緒原因としては氣象上の要因特に氣溫の變化に伴ふ水溫の昇降が先づ考へられる。昭和 8 年の惡變現象を呈した時には氣溫は平年より明らかに高く又連日無風狀態が續き湖水の溫度が異常に上昇したと記錄されて居る(10)。昭和 14 年夏季特に 7 月に於も同樣に第 2 圖の如く平均して氣溫は 1.0～1.4°C 高かつた。水溫の上昇は湖水中に於ける物質循環を促進せしめるも，惡變せしめる決定的要素とは必ずしも考へられない。何故なれば斯樣な湖水の惡變現象は往々冬季に於ても發生するからである。



第 2 圖 昭和 14 年夏季の氣溫及び 10 年間の夏季平均氣溫

ii. 水質の變化 各調査時に於ける湖水水質の內，先づ最も變化の著しい鹽分量のみに就て纏めると第 2 表に示す如くであつて，惡變現象と可成り明瞭な關係を認め得る。即ち湖水に異狀を來した時は鹽分含有量は割合に多く，2.0 g Cl/l 以上にして，湖水が正常な時は 1.3 g Cl/l 以下であることが知れる。この關係は一般に夏季の降雨量が多かつた年に本湖の魚類生產量の多いことをよく說明する。

---

1) 全窒素の定量は江良技師の厚意によつて出來た。茲に同氏に對して深謝する。

2) 湖水中の各種榮養物質の循環がよく平衡狀態を得て，プランクトンの繁殖と底棲生物の饒產する狀態を正常な湖水の狀態とし，反對に底土は酸化分解から還元分解に變り有害な還元物質を發生して底棲生物を死滅せしめプランクトンの種類に變化を來し，遂には魚族の生育が不良となる狀態を假に惡變現象を呈したと表現する。

第 1 表　惡變前後に於ける佐鳴湖の水質，底質及び底棲生物の變化

Date		Air temperature (°C)		Transparency (m)	
1938, June 18			25.1～27.5		——
1939, Oct. 15			24.0～25.3		0.75～0.80
1940, Mar. 17			9.0～ 9.7		1.0 ～1.2
Number of stations	1	2	3	4	5
Depth in meters	1.80 1.80 1.40	1.90 2.15 2.00	2.20 2.20 2.00	2.30 2.20 0 2.1	1.00 1.50 1.50
Bottom material	grey Sm 〃 〃 〃 〃	grey m 〃 〃 〃 +black m	grey m black m. 〃 〃	grey m 〃 〃 〃 〃	grey Sm 〃 〃 +brown m
Surface water temperature (°C)	25.2 22.5 10.15	24.4 22.8 10.2	24.4 22.4 10.2	24.6 22.5 10.5	24 6 22.8 9.8
O_2 saturation in %, surface & (bottom)	—— 137 (125) 104 (104)	—— 139 (17) 107 (106)	—— 132 (42) 106 (101)	—— 133 (71) 109 (102)	—— 125 (115) 107 (107)
pH (P. R.), surface & (bottom)	8.4 (8.3) 9.4 (9.3) 8 5 (8.5)	8.4 (8.3) 9.4 (7.5) 8.5 (8.5)	8.4 (8.3) 9.4 (8.2) 8.5 (8.5)	8.4 (8.3) 9.4 (8.9) 8.5 (8.5)	6.7 (7.4) 9.4 (9.3) 8.5 (8.5)
Mud temperature (°C)	22.2 21.7 10.2	23.2 21.8 10 5	22.5 22.2 10.3	22.5 22.6 10.3	22.8 22.0 10.0
Mud pH (P. R.)	7.8 7.5 7.3	7.5 7.3 7.4	7.0 7.5 7.4	7.0 7.3 7.4	7.0 7.4 7.4
Mud moisture in %	38.29 49.90 40.44	73.29 84.60 81.90	80.8 82.2 84.38	75.1 82.1 80.9	36.45 55.40 63.68
Free H_2S expressed as ‰ of H_2S in dry mud	0.12 0.084 0.055	0.46 0.334 0.459	0.69 0.168 0.582	0.39 0.261 0.342	0.18 0.145 0.160
Total H_2S in ‰ of dry mud	0.57 0.65 0.192	0.86 2.83 2.87	1.91 1.99 3.00	0.93 2.54 2.18	0.41 1.16 0.312
Loss on ignition as % of dry mud	4.35 6.13 4.34	14.58 17.37 17.15	15.00 16.73 18.28	17.69 15.98 15.64	— 7.61 10.34
Bottom fauna per m^2, Chironomid larvae	1012 0 37	1214 0 31	1301 0 2	1347 39 24	808 19 219
Tubificidae/m^2	447 286 843	66 105 71	0 0 0	28 40 0	847 1438 657

（第 1 表つづき）

Number of stations	1	2	3	4	5
Mollusca (*Corbicula japonica*)	4 10 10	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
Weight of samples (g) excluding Mollusca	6.1 — 4.7	14.1 — 3.2	12.8 — 0.5	21.4 — 0.5	8.8 — 9.5

第 2 表　惡變時に於けるプランクトン相の變異

Date	Cl mg/*l*	Main plankton		Conditions of the lake
		cc	c	
1933, Aug. 30 Simizu and Kurasige	1935 (Aug. 8)	died *Clathrocystis*	*Monostyla*	Almost all fishes died
1934, June 19, Inaba	2547～3429	*Brachionus*	*Limnocalanus* Copepodid larvae	Restored slightly
1938, Feb. 22	595～1295	*Limnocalanus* Copepodid larvae	*Brachionus*	Good conditions for fishes
1938, June 15		*Clathrocystis Keratella*	*Merismopedia*	Good conditions for fishes
1939, Sept. 5	3279～3312	*Oscillatoria*	*Dictyosphaerium Chaetoceras*	Bottom mud changed into a black one or Sapropel. Fishes except Mugilids showed a slight growth
1939, Oct. 15	1839～2880	*Oscillatoria*	*Dictyosphaerium Chaetoceras*	
1940, Mar. 17	1163～1317	*Brachionus*	*Fragilaria Pleurosigma*	Restored slightly. A remarkable recovery was noticed on the littoral zone.

iii. **底質の變化**　本湖の如く其の底質が微細な粘土によつて形成され且榮養物質の豐富な泥土に海水が侵入する時は，泥土は其水分含量を增加すると同時に還元泥に變化することは旣によく知られて居る (4)。本研究に於て 1938～40 に亙る湖水惡變前後に於ける泥の水分含有量を第 1 表によつて觀るに 1940 年 10 月採集のものは明らかに數 % 增加して居る。卽ち多量の鹽類の侵入によつて泥土中の無機乃至有機膠質物が物理化學的な變化を來し

た爲と考察される。次に泥土の還元度を示す物質として泥土の硫化水素並に硫化物を定量し[1]，之を湖水の狀態と比較考察するに，兩者の間に明らかな關係が認められる。即ち湖水の狀態が正常な時に於ては全硫化物は 0.4～1.9‰ にして，一旦湖水が惡變狀態になると最大値は 3‰ にも達し，泥土は外觀からも明らかに黑色還元泥となつたことを認め得る。此の時の泥土の pH は少しく高いが，第1表に見らるる如く表層水に酸素が飽和せる時に底層水の酸素は著しく少量であるから，生物の棲息には不適當なる底成層 (Microstratification) の存在が想像される。

iv. 生物相の變化 鹽分量の變化と共に之に伴つてプランクトンの相(Phase)にも變化が起り，湖水が正常の時は夏季藍藻類主として *Clathrocystis* が多量に繁殖し，異常の際には *Oscillatoria* 或は輪蟲類の *Brachionus* が優先種として認められる（第 2 表)。此の現象は濱名湖沿岸に於ける養鰻池に屢〻起る所謂“水變り”(3) 現象に酷似して居る。昭和 8 年 8 月の湖水惡變に際しては重要魚族及び其の他の有用生物の大半は斃死したが，昭和 14 年夏季に於ては，前述の如く有毒な還元物質に對して敏感なユスリカ幼蟲が湖底から姿を消し又プランクトン相の變化を來した。魚類に於てはワカサギの成長が第3表に示す如く著しく阻害され且又鰻，鯉及び鮒の成育も妨げられた。之に反し褐色の有機物を多量に含める水にも適應した鯔は例年より反對に成長がよかつた。昭和 15 年夏季に於ては前年より一層烈しい變化をなし，放流後生育せるワカサギは殆ど全滅した。以上の様な湖水の惡變に對して銳敏なワカサギを過去數年間に亙り調べた結果に就て見るに第 3 表に示す如く，湖水の惡變した昭和 8 年及び 15 年には殆ど漁獲はなく，昭和 9 年及び 15 年に於ては例年より漁獲が少かつた。尙ワカサギの體形が漸次小さくなり其の孕卵數が著しく減少して來たことは以上の湖水異變にのみ基因するか否かは現在未だ判然しないが本湖の經營上注意す可き現象である。更

1) 昭和 13 年 6 月に於ける泥土の硫化物の定量は吉村氏等の用ひた方法 (15, 16) (Strøde, W. 1933) に據つたので第 2 回及び第 3 回（第 1 表）の結果とは比較し難い。特に遊離の硫化水素は微量である故に一層不確實であると思はれるが，全硫化物の量としては相當多い故に，比較實驗の結果小數點以下 1 桁迄の數値は稍〻信じ得る。

第 3 表 移殖ワカサギの魚獲，體形，性比，孕卵數の變遷

Date	Numbers of specimens	Av. total length (mm)	Av. body weight (g)	Sex ratio	Av. number of eggs	Quantity of catch
1935, Jan. 7	38	109.6	8.04	14 : 24	13170	Nil
1936, Feb. 21	100	91.9	4.66	36 : 62	14220	Little quantity
1938, Feb. 22	100	78.5	2.40	36 : 64	3107	About 5600 kg
1940, Feb. 11	142	73.6	2.25	45 : 96	2598	About 4500 kg
1941, Feb. 20	100	66.7	1.60	54 : 52	1537	Nil

に昭和 16 年に於ける其の性比が前四回の場合より稍ゝ趣を異にして居る事實は又生物學上興味ある點である (7)。

惡變現象への對策

以上の檢討により湖水の惡變現象の直接原因は海水と湖底堆積物との生化學的反應により新生せる硫化水素及び硫化物であることが明かになつた。湖水異變が大抵夏季に發生するのは氣溫の上昇のみでなく 7 月或は 8 月の大潮時の潮位が一年中で一番高い爲と思惟される。この時季に於ける張潮時の氣壓其の他の天候條件により潮位が異常に上昇した場合には，濱名湖の主湖盆と水準面に殆んど差のない佐鳴湖に海水が水道を通つて逆流することが實際に認められる。夫故に本湖水の異常現象を防止し湖の生產を增加せしめる爲には海水が一時的に多量湖內に逆流入することを防止するにある。吾々の此の提案によつて本湖の經營者は直ちに之を實現す可く種々の準備を進めて居るので其の效果は括目される次第である。

要　約

1. 佐鳴湖の水質及び底質の生化學的研究を行ひ，湖水の正常な時と異常を呈した時の狀況を比較した。

2. 湖水が正常な時には夏季植物性プランクトンの繁殖著しく底棲生物も豐富にして生產量は多いが，不良の時には搖蚊幼蟲は全滅し且プランクトン相も變轉して生產量は低下する。

3. 湖水の異常を來す直接の原因は濱名湖の主湖より佐鳴湖水道を逆流して來る海水が底土と生化學的に反應して硫化水素及び硫化物を新生するにあ

ると考察される。

4. 海水の逆流を防ぐ事により湖を常に正常に保ち得る對策を提案した。

文　献

1. 青木赳雄, 1911：佐鳴湖のプランクトンに就て. 水產研究誌, 7；4.
2. 稻葉　俊, 1934：佐鳴湖調查. 靜岡縣水產試驗場報告, 31.
3. ——, 1937：養鰻池の「水變り」に關する豫察的研究. 靜岡縣水產試驗場濱名湖分場.
4. ——, 清石禮造, 1941：養鰻池の底質の性狀と其の改良に關する研究. 同上.
5. 海洋氣象臺, 1936：海洋觀測法.
6. 川名　武, 1936：三方湖群の異常現象に就て（Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ）. 水產研究誌, 31：7, 8, 9.
7. 片岡　群, 1935：ワカサギの孕卵數に就て. 靜岡縣水產試驗場報告, 31.
8. Miyadi, D., 1931, '32：Studies on the bottom fauna of Japanese lakes. Ⅱ, Ⅳ. Japan. Jour. Zool., 31, 259～297.
9. 靜岡縣水產試驗場, 1912：濱名湖調查報告書.
10. 清水光夫, 倉茂英次郎, 1933：佐鳴湖に於ける魚類斃死の原因に就て. 氣象集誌, 12；3.
11. 清水光夫, 1937：濱名湖觀測調查報告（Ⅰ）. 濱松測候所.
12. 清石禮造, 富山哲夫, 1941：濱名湖に於ける牡蠣の斃死と底土中の硫化物含量との關係. 日本海洋學會誌 1, 1.
13. 田中阿歌麿, 1922：趣味の湖沼學.
14. 富山哲夫, 神崎瑞夫：日本農藝化學誌に近く發表.
15. 吉村信吉, 和田憲夫, 1938：湖底堆積物特に鹽水湖の湖底堆積物中に含まれる硫化水素並に硫化物の豫察的研究, 本誌 2, 2.
16. Yoshimura, S. and Wada, T., 1938：Hydrogen sulphide and ferrous sulphide in the bottom deposits of brackish water lake, Hamanako, Sizuoka Prefecture. Proc. Acad. Tokyo, 14.

Tetuo Tomiyama

BIOCHEMICAL STUDIES ON NUTRITION UNDER SPECIAL ENVIRONMENT. I. AN APPARATUS CAPABLE OF KEEPING THE REDUCED PRESSURE CONSTANT

Reprinted from the Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, Vol. 9, No. 1, March 31, 1948

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 1
March 31, 1948

BIOCHEMICAL STUDIES ON NUTRITION UNDER SPECIAL ENVIRONMENT

I. AN APPARATUS CAPABLE OF KEEPING THE REDUCED PRESSURE CONSTANT*

Tetuo Tomiyama

For purposes of examining the effects of reduced pressure upon nutrition, it is prerequisite to have an apparatus enabling us to maintain the experimental animal under a constant reduced pressure. An attempt has been made, accordingly, to set up an appropriate apparatus by using the usual laboratory facilities. Experiments have also been carried out to examine several factors governing the efficiency in automatic control of reduced pressure.

1. The Description and Manipulation of the Apparatus

A. Description of the Apparatus

Fig. 1 shows a diagram of the apparatus. FM is a flow-meter, F_1 and F_2 are equipments used for calibration of the flow-meter and ordinarily not connected with FM. D is a desiccator of about 10 litre capacity, having one thermometer and two tubes, one for the inlet of air, the other for evacuation. E_1 and E_2 are suction flasks, E_1 is provided with a manometer M, for the measurement of pressure in D. E_2 is connected, on the one hand, with a regulator of reduced pressure, MR and, on the other, with a magnetic valve, B. The magnetic valve can be operated by a 10 volt accumulator and a magnet having a resistance of 600 ohm. MR

* An abstract of this paper was presented before the Agricultural Chemical Association at Fukuoka, Dec. 2, 1944.

has a movable terminal of platinum wire Pt, which can be adjusted at any required reading of the manometer. C_0 is a large stop-cock, installed with a dial enabling us to regulate the passage of air through the cock. C_1 is an ordinary stop-cock connected with a water suction.

B. Technique of Manipulation of the Apparatus

1) Preliminary adjustment: Fix a platinum wire Pt at particular reading of reduced pressure needed for the experiment. Measure the rate of air flow by the flow-meter FM. The flow-meter may be calibrated by a following procedure. Use is made

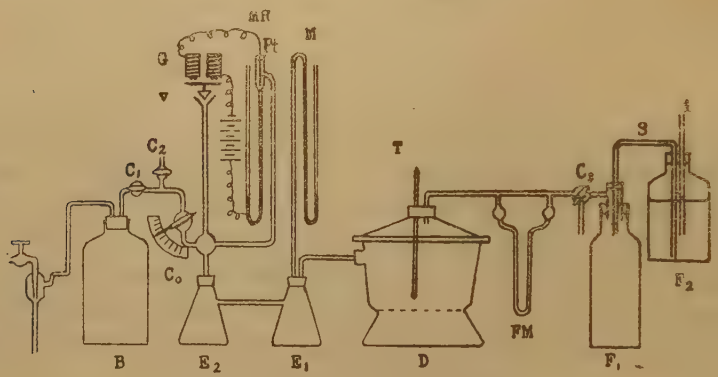


Fig. 1. Diagram of the Apparatus

of a special equipment F_1F_2, being connected to FM in case of the calibration. By sucking the air in F_1 through C_3, the water in F_2 will flow down and fill siphon S. Since the bottom level of siphon S in F_1 is adjusted so as to be at the same level of the lower end of tube i, water will not drip into F_2, if no leakage exists in F_2. Then, on connecting F_1 with FM through C_3, a a certain quantity of water equivalent to the volume of air being sucked into D through FM will drip into F_1 from F_2. Hence, several measurements of the volume of water at various degrees of reduced pressure in vessel D will give the calibration for readings of the flow-meter.

2) Manipulation: Put experimental animal on the wire gauze in D. After closing stop-cock C_2, open C_1, and gradually open regulating stop-cock C_0, observing the rate of rise in the

mercury column in M. If the pressure is reduced to a required degree, the mercury surface in MR will make contact with the platinum wire, fixed at the required reading; electrical circuit will close, making magnet B work so as to open valve V. When the pressure in D rises mercury surface in MR will move down, breaking the electric circuit and stopping the valve V. Thus in repeating the electrical contact, automatic control of the pressure can be carried out without any difficulty within the variation of ± 1 mm. mercury. To release the reduced pressure, first close both C_0 and C_1, and open C_2, then gradually open C_0, care being taken in the rate of pressure-rise by observing the mercury surface in M.

2. Examination of Factors Governing the Accuracy of Automatic Regulation of Reduced Pressure

Fine regulation of the reduced pressure can be obtained by finding an ideal condition which affords a minimum frequency as well as a minimum magnitude of up-and-down movement in the manometer, provided that the magnet and the regulating valve work without clogginess.

Two examples of the observations are shown in Table 1. It will be seen from Table 1 that the reduction in number of contacts between platinum wire and mercury in the manometer can be achieved by either reducing evacuation capacity of pump or inserting several reservoirs of air between the suction and the regulator. Experiments, on the other hand, show that minimizing the number of contacts is always followed with an increase in magnitude of a sudden change in the manometer-reading after the contact. Hence, it is a difficult task to realize the above-mentioned ideal condition required for the fine regulation of reduced pressure.

It will be noticed in Table 1, however, that the magnitude of change in manometer-reading shows values less than 0.7 mm. mercury, if the number of contact be over about thirty per 20 minutes. The frequent contacts between the platinum wire and the mercury causes an oxidation film on the contcat surface by the electric spark, unless the vacuum tube relay is not used. Therefore, it is recommended that the number of contacts be kept

Table 1. Number of contacts in 20 minutes and magnitude of change of pressure.

Insertion of bottles shown in Fig. 2 / Range of deviation in mm. Hg.	Atmospheric pressure corresponding to 7,000 m.								Atmospheric press. corresponding to 9,000 m. (two suctions applied)			
	abcde		abce		abe		ae	e	abcde	abe	ae	be
0.00—0.50	0	8	35	56	48	96	95	166	0	100	213	76
0.51—1.00	0	24	5	0	7	0	3	7	12	12	0	39
1.01—1.50	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0
2.51—3.00	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.01—3.50	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total number of contact	8	32	40	56	55	96	98	173	19	112	213	115

to about thiry to fifty per 20 minutes, by either regulating the evacuating capacity of the pump or by inserting air reservoirs between the suction and the regulator.

So far as the number of air reservoirs are concerned, the insertion of a bottle B shown in Fig. 2 is indispensable if the

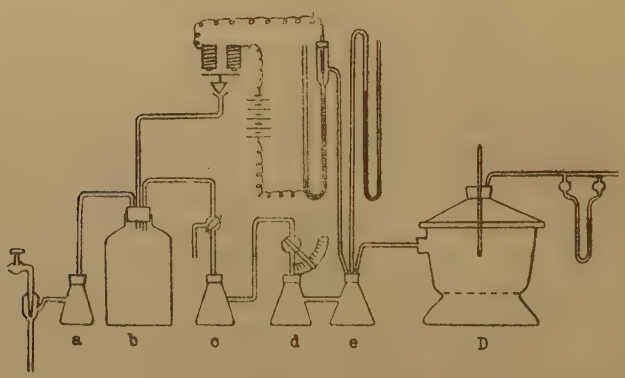


Fig. 2. Arrangement of Air Reservoirs

reduction of pressure in the vessel within a short time-interval be required, because a sharp evacuation requires having a vacuum chamber sufficient to reduce the pressure in D within a few minutes. If it is wished, however, to eliminate a bottle B, a

rotary pump of high evacuating capacity should be used instead of water suction.

It is further noticed that, when the regulating manometer is separated from the magnetic valve by the regulating stop-cock shown in Fig. 2, lag is always observed in the response of the manometer to the inlet of air. Hence, it is necessary to have the magnetic valve located quite close to the pressure-regulator.

3. Summary

1. The description has been made of an apparatus capable of of keeping the reduced pressure constant for quite some duration.

2. Observations of factors governing the control of constant reduced pressure have shown that the variation of reduced pressure can be maintained within 0.7 mm. mercury by controlling the number of contacts in the regulation of manometer to over 30 per 20 minutes.

3. Experiments have shown that locating the magnetic valve close to the pressure-regulator and minimizing the number of air reservoirs are important for the accurate regulation of reduced pressure.

In conclusion, the author wishes to express his hearty thanks to Mr. T. Yabuki and Mr. H. Takahashi for their earnest assistance throughout the experiment. Thanks are also extended for a grant from the Research Fund of the Ministry of Education.

Tetuo Tomiyama, Teruo Yabuki, and Sizue Nakao

BIOCHEMICAL STUDIES ON NUTRITION UNDER SPECIAL ENVIRONMENT. II. THE EFFECT OF REDUCED PRESSURE UPON DIGESTIBILITY

Reprinted from the Journal of the Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Vol. 9, No. 1, March 31, 1948

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 1
March 31, 1948

BIOCHEMICAL STUDIES ON NUTRITION UNDER SPECIAL ENVIRONMENT

II. THE EFFECT OF REDUCED PRESSURE UPON DIGESTIBILITY*

Tetuo Tomiyama, Teruo Yabuki and Sizue Nakao

On repeating the exposure to reduced pressure, the metabolism of living organisms is subjected to remarkable changes in many respects. In addition to vitamins and caloric sources, the body protein will be consumed to a great extent. In order to maintain the normal nutrition under such environment, it might be important to have an adequate supply of protein. The efficient supply of protein will depend largely on the digestibility of protein material as well as the amount of its intake. It has not been shown whether or not the digestibility of food ingested might be changed by keeping a test animal under reduced pressure. So, by using albino rats, determinations have been made on the changes in the digestibility of various protein-component of synthetic diets by exposing the test animals to reduced pressure for two hours a day. Furthermore, the effects upon the digestibility of a nitrogenous component of easily digestible synthetic diet, after exposure to reduced pressure, have also been estimated.

1. Experimental Method

The synthetic diets used comprise three kinds as shown in Table 1. In every case, crude protein-content in the diet is adjusted

* An abstract of this paper was presented before the Agricultural Chemical Association at Fukuoka, Dec. 2, 1944.

to be 15%. The mixture of peptone and amino acids in the diet was prepared by autolyzing sardine in acidic medium at 50°C. for ten hours. The analysis of the mixture gives no protein- and metaprotein-N, 14% for proteose-N, 24.8% for peptone-N, 17.3% for subpeptone-N and 43.8% for amino-N.

Table 1. The composition of diets

Components of diet / Kind of diet	Sardine meal	Mixture of peptone and amino acid**	Mixture of vegetable oil and liver oil	Whole milk powder §	Wheat starch	Salt mixture	Yeast	B_1 concentrate (Oryzanine)	B_1 hydrochloride
Fish meal-diet	21	—	10*	—	60	3	5	2.5cc.	—
Peptone-diet No. 1	—	28	10	—	60	3	5	2.5cc.	—
Milk-diet	—	—	5†	64	23	3	5	—	20γ per each rat
Peptone-diet Nor. 1	—	28	5	—	65	3	5	—	20γ per each rat

* C.L.O. unit=7 † C.L.O. unit 14 § 3.78% total nitrogen, 8% fat, 7% moisture. **9.47% total nitrogen

The weighed amount of food was always given about 9 a.m. Daily records were kept of food consumption. The feces was collected about noon just after exposing to reduced pressure.** In order to collect feces not contaminated with urine, a sufficiently fine wire gauze was placed under the cage of the test animal. When exposing the test animal to reduced pressure, a fine wire gauze under the coarse one, on which the specimen rested, was used. The feces, after being acidified with hydrochloric acid, was dried at 70°C. and weighed. Dried food and feces were analyzed for nitrogen. The digestibility of solid matter or nitrogenous matter has been calculated by the following formula.

$$D=\frac{F-f}{F}\cdot 100, \qquad D_N=\frac{F\cdot N-f\cdot n}{F\cdot N}\cdot 100,$$

** Several preliminary experiments have shown that food ingested is ordinarily excreted after 8-9 hours under normal atmospheric pressure. It was observed, however, that after exposing to reduced pressure no excretion of feces took place for 4-6 hours, probably due to abundat excretion on sharp reduction of pressure.

where, D and D_N, digestibility of solid matter and nitrogenous matter, respectively; F and f, dried weight of food ingested and feces excreted, respectively; N and n, content of nitrogen in F and f, respectively. The determination of digestibility has always been carried out after several days of preliminary feeding and exposure to reduced pressure.

Albino rats used were from the same litter. By using the special apparatus reported in the preceeding paper, the experimental animals were exposed for two hours every day to reduced pressure of 300 mm. mercury corresponding to the altitude of 7,000 m., about 200 cc. air being supplied during the exposure. The rate of reduction of pressure was 90 mm. mercury per minute. A preliminary experiment had been carried out to find an appropriate time of exposure to reduced pressure. It was found that exposure for more than three hours gave so drastic an influence that sometimes death resulted especially at higher temperature. Daily exposure for two hours, accordingly, has been adopted.

Furthermore, it has also been examined in the preliminary experiment whether or not feces excreted on exposure to reduced pressure may show indigestive character, since an abundant amount of feces is usually excreted at the start in the reduction of pressure. Table 2 will clearly show that no difference in nitrogen-content is found between normal feces and feces excreted following exposure to reduced pressure.

Table 2. The nitrogen-content of feces on exposure to reduced pressure compared with feces under normal pressure

Kinds of feces / Date	Fish Meal-Diet Feces excreted under						Peptone-Diet Feces excreted under					
	normal pressure			reduced pressure			normal pressure			reduced pressurs		
	Dried wt.	Mois-ture	N	Dried wt.	Mois-ture	N	Dried wt.	Mois-ture	N	Dried wt.	Mois-ture	N
V/26	3.10	31.2	5.36	1.77	32.0	4.81	3.75	53.0	4.10	1.12	53.5	3.70
27	2.11	34.0	5.73	1.25	35.0	4.54	4.60	35.0	4.13	0.90	36.0	4.06
30	2.05	26.8	4.92	0.96	40.1	4.72	3.82	22.0	3.46	1.78	31.5	3.60
31	0.81	10.3	4.29	1.66	33.4	4.58	2.45	18.4	3.88	1.78	31.6	3.77
VI/ 1	2.22	17.9	4.64	1.52	34.0	4.56	2.53	18.5	3.53	1.70	32.0	3.73
2	1.52	20.1	4.67	1.87	35.5	3.96	2.14	33.2	—	1.13	24.7	—

2. Experimental Results

Results obtained by comparing the milk powder- or fish meal-diet with the peptone-diet are shown in Table 3, 4, 5, and 6. All the data are summarized in Table 7.

Table 3. Digestibility of fiish meal-diet, rate of growth, and food ingested at 28—30°C.

Date	Under Reduced Pressure								Under Normal Pressure							
	Body wt. ♀		♂	Food ingested		D		D_N		Body wt. ♀		♂	Food ingested		D		D_N	
VII/6	92	86	10.2	11.0	88.0	87.5	80.6	78.5	90	111	11.7	12.8	88.4	86.7	77.8	76.8
7	97	89	10.7	10.7	76.8	88.7	52.5	77.2	94	118	11.1	13.9	88.6	87.0	74.8	74.5
9	102	94	9.1	10.4	90.2	90.0	79.1	80.7	99	129	10.4	17.3	92.4	91.4	87.2	85.6
10	102	92	7.0	7.4	84.9	73.7	72.0	68.6	101	135	9.1	15.8	84.6	83.0	69.2	79.5
11	102	95	7.2	7.2	88.5	92.5	79.1	88.2	105	140	9.5	15.6	91.9	88.2	85.9	79.6

Table 4. Digestibility of peptone-diet, rate of growth, and food ingested at 28—30°C.

Date	Under Reduced Pressure								Under Normal Pressure							
	Body wt. ♀		♂	Food ingested		D		D_N		Body wt. ♀		♂	Food ingested		D		D_N	
VII/6	97	96	10.4	11.8	95.2	96.0	93.3	93.7	100	102	11.1	12.2	94.6	90.3	92.9	80.0
7	99	99	8.6	8.6	95.6	96.3	92.3	91.9	104	108	10.9	12.3	92.7	95.1	85.6	92.8
9	103	104	6.9	8.0	95.3	94.5	92.1	89.6	111	117	8.7	11.0	95.0	93.4	92.3	87.1
10	103	102	6.3	7.0	95.7	92.4	92.2	86.5	110	114	8.5	10.0	96.2	93.5	93.5	90.0
11	107	106	8.6	11.8	95.8	99.0	93.1	98.6	111	118	11.2	12.8	95.2	97.2	91.5	95.9

Difference of digestibility between the peptone- and the milk powder-diets was 3.6% in solid matter, and 5.7% in nitrogenous matter. When exposed to reduced pressure, the difference was greater, i.e., 6.5% in solid matter and 8.7% in nitrogenous matter. However a more pronounced difference has been observed between the peptone- and the fish meal-diets. It is a remarkable fact that peptone can be utilized 8.7% more efficiently than the protein of

Table 5. Digestibility of milk-diet, rate of growth, and food ingested.

Date	Under Reduced Pressure								Under Normal Pressure							
	Body wt.		Food ingested		D		D_N		Body wt.		Food ingested		D		D_N	
	♀	♂							♀	♂						
IX/6	79	72	6.7	6.3	86.9	86.1	81.5	80.0	72	78	7.2	7.7	84.8	86.6	81.1	81.8
7	81	73	7.2	6.6	90.3	89.9	87.2	85.3	75	81	7.2	8.4	91.1	92.6	88.3	89.6
8	85	75	9.6	7.7	91.6	91.0	87.8	86.3	76	85	8.3	9.6	92.0	93.2	88.5	89.5
9	83	73	9.3	4.9	90.5	82.6	85.5	79.0	79	87	7.5	8.9	88.0	89.2	82.8	83.3
10	89	77	8.5	6.8	88.0	—	85.4	—	81	88	8.5	8.0	92.0	89.2	88.5	85.6
11	91	79	7.4	6.8	91.0	86.5	88.5	82.8	85	92	8.0	8.5	88.9	90.4	85.0	87.5
12	94	83	8.4	8.4	91.1	88.2	88.3	82.8	89	97	9.6	9.0	93.8	93.8	90.5	91.2
13	98	86	8.0	8.0	86.6	87.7	85.3	83.8	90	99	9.1	8.5	89.2	87.9	84.0	82.5
14	99	88	7.5	8.1	86.6	85.4	84.0	81.3	94	102	9.3	9.3	90.7	91.0	85.2	86.5
15	101	90	7.3	7.3	91.5	89.4	89.0	84.1	99	107	9.1	9.7	93.4	93.3	90.1	90.4
16	103	93	8.0	8.0	85.9	86.3	83.5	81.4	101	110	10.8	9.1	89.0	89.4	84.6	85.3

Table 6. Digestibility of peptone-diet, rate of growth, and food ingested

Date	Under Reduced Pressure								Under Normal Pressure							
	Body wt.		Food ingested		D		D_N		Body wt.		Food ingested		D		D_N	
	♀	♂							♀	♂						
IX/6	73	62	9.9	10.1	93.7	90.7	91.5	88.7	66	69	11.8	7.4	93.6	94.8	91.1	93.5
7	71	65	7.2	8.1	93.6	93.0	90.0	90.0	69	75	9.6	11.0	95.5	94.1	92.8	90.5
8	74	69	8.0	7.5	94.4	93.7	92.5	92.0	70	71	9.5	3.5	93.7	—	91.1	—
9	75	69	9.1	9.1	94.0	93.8	92.2	92.1	73	69	9.5	7.3	94.9	—	93.2	—
10	79	71	9.0	7.3	93.7	96.9	91.0	95.7	75	72	9.4	8.6	95.2	95.0	93.1	92.7
11	81	74	8.0	7.1	92.7	95.8	90.9	95.3	74	76	8.8	9.7	92.7	93.3	90.2	91.9
12	86	77	9.2	8.8	94.9	96.5	93.7	95.5	80	83	9.2	10.6	90.5	91.4	87.8	89.1
13	86	79	9.2	10.7	96.0	97.4	95.3	97.2	84	88	11.6	11.6	94.6	94.6	93.3	94.0
14	90	79	13.4	10.8	95.0	98.3	94.0	97.8	87	85	15.9	14.0	94.8	96.4	93.5	95.7
15	95	81	9.4	6.7	96.5	94.1	95.5	92.7	91	92	10.7	8.9	95.0	96.1	93.9	94.7
16	98	84	9.9	8.3	92.6	93.3	91.1	91.6	94	95	9.1	9.1	94.0	91.2	92.5	88.6

milk and 16.6% more efficiently than the protein of fish meal. This result certainly favors the use of peptone as a protein-source in aviator's rations.

Table 7. Summary of the Results

	Increase in body weight per g. food				D		DN		D		DN	
	Fish meal diet	Peptone diet	Milk diet	Peptone diet	Fish meal diet	Peptone diet	Fish meal diet	Peptone diet	Milk diet	Peptone diet	Milk diet	Peptone diet
Normal press.	0.33	0.25	0.32	0.25	88.2	94.5	79.2	90.3	90.6	94.2	86.5	92.2
Reduced press.	0.21	0.23	0.27	0.24	86.2	95.6	75.7	92.3	88.2	94.7	84.5	93.2
Difference	−0.12	−0.02	−0.05	−0.01	−2.0	+1.1	−3.5	+2.0	−2.4	+0.5	−2.0	+1.0

It is of particular interest to note that milk- and fish meal-diets are digested to less extent on exposure to reduced pressure, whereas the peptone-diet is digested to a somewhat greater extent. This decrease in digestibility may be accounted for by the decrease in secretion of digestive enzymes due to the effect of exposure to reduced pressure. It is also apparent that the assimilability of peptone will not be changed to any extent by the decrease in secretion of the enzymes.

It is to be pointed out that the value of increase in body weight per unit weight of peptone-diet remained almost the same on exposure to reduced pressure while the value per unit weight of milk-diet decreased by about 15%. This will also prove the efficient utilization of peptone-diet in the animal body under such drastic effect.

3. Summary

1. By exposing albino rats to reduced pressure, an appreciable decrease has been noticed in the digestibility of solid as well as the nitrogenous matter of diet containing fish meal or milk powder as protein-source.

2. No decrease, by exposing to reduced pressure, has been observed in the digestibility of diet containing a mixture of peptone and amino acids.

3. By keeping the test animal under reduced pressure for two hours daily, peptone can be utilized 8.7% more efficiently than the protein of milk and 16.6% more efficiently than the protein of fish meal.

4. These experimental findings give credence to the presumption that the secretion of digestive enzymes, especially proteolytic, may decrease in appreciable amount only by keeping the specimen under reduced pressure for two hours.

We wish to express our hearty thanks to Mr. H. Takahashi and Miss T. Shiga for their helpful assistance. This study was carried out in part with the aid of a grant from the Research Fund of the Ministry of Education.

魚体の液化に関する生化學的研究

Ⅰ. 魚体液化の基礎條件について

富山哲夫・杉原喬

Biochemical studies on the liquefaction of fish body

I. On basic conditions for the liquefaction

Tetuo Tomiyama and Takashi Sugihara

九州大學農學部學藝雜誌 第十三卷 別刷
Reprinted from the Science Bulletin, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Vol. 13, Nos. 1～4, November, 1951

魚体の液化に関する生化學的研究

I. 魚体液化の基礎條件について

富山哲夫・杉原喬

Biochemical studies on the liquefaction of fish body

I. On basic conditions for the liquefaction

Tetuo Tomiyama and Takashi Sugihara

I. 緒　　言

わが国の水産物の內で過半を占めるものは，限られた季節に短期間に多量漁獲される所謂多獲魚であるから，この高度利用が成功しなければ，たとえ漁獲が增強されたとしても，国民の栄養に寄与しえないのは論をまたないところである．従来採用されている多獲魚の処理法としては魚体より魚粉及び魚油への還元，即ち Reduction process がある．この方法の原理は先づ急速な加熱により魚体の酵素を破壞して液化現象を中止させ，同時に附着細菌を死滅させて原料の安定を計り，しかる後に圧搾により魚油とエキス成分とを分離し，凝固蛋白を乾燥することにある．従てこの方法には多量の熱量を必要とする欠点がある．しかも多季の漁獲物では魚体の酵素を破壞するに充分な時間煮熟することが困難な為に，魚粉及び魚油の品質の低下を招来し勝ちである．

しかし魚体の処理加工に当つては，附着細菌の死滅或は繁殖防止の操作は省略できないこと勿論であるが，もし魚体の酵素の破壞を省略できるとすれば，高熱処理をむしろ必要としないので，多量の熱量を節約できる筈である．かような目的を達するには，細菌の発育を阻止すると共に酵素作用の進行に対して好適な條件を求めねばならない．かような試みとしては，食塩で細菌の発育を阻止しつつ自己消化を常溫で行わせる魚醬油の製造方法が古来行われている．また本研究を発表[1]した後に，大島氏[2]及び鉄本氏[3]は食塩添加後比較的高溫に放置する魚醬油の速醸法について報告している．しかし食塩によつて細菌の発育を阻止する之等の方法では，必然的に多量の食塩が製品に含まれるので，その用途は醬油代用に限られることになる．

依て著者等は水素イオンのもつ細菌発育阻止作用[4]と筋肉自己消化の促進作用[5]とを利用せんとして，昭和16年以来研究を展開し，昭和17年に液化の基礎條件の概要を発表したが，ここにその詳細を報告したい．本研究では先づ魚体液化中の腐敗に対する水素イオンの防腐作用とそれに及ぼす溫度の影響につき種々吟味を試みた．その結果，安全に液化しうる條件は或る極限された範囲內にあることが確かめられたので，種々の條件に於ける液化度を決定し，更に食塩を使用する方法との優劣についても比較を行つた．

II. 実 驗 方 法

供試料としては，常に全魚体を肉枠器に数回かけて粥状にしたものを用いた．pH は著者の一人（富山）が吟味したアンチモン電極法[6]により，また時に比色法をも用いた．液化度は可溶性窒素（S-N）及び全窒素（T-N）を次の方法によつて定量し，S-N×100/T-Nによつて計算した．但しこの液化度の値は見掛けの値であつて，嚴密には液化開始前の可溶性窒素を控除すべきであるから，二三の実驗に於てはこの補正を行つた．

可溶性窒素の定量は液化後 1/3 容の 10% TCA（Trichloracetic acid）を混和し，30分後濾過し，濾液の一定量につきミクロケルダール法によつて行つた．全窒素は TCA 添加前の消化液をよく振盪して均一の懸濁としたものより一定量をとり，ミクロケルダール法によつて定量した．

III. 実驗結果及び考察

1. 液化に対する水素イオン濃度の影響

予備実驗として，100 g のイカナゴの擂碎粥に McIlvain 緩衝液 50 cc を加えて pH 5.0～7.2 の範囲に7試驗区をつくり，38°C に 24 時間放置したところ，トルオールを加えなかつた場合には皆瓦斯を発生して腐敗した．

次にマイワシの擂碎したもの 100 g に適量の n-塩酸或は n-苛性ソーダと水との混合液 50 cc を加えて，pH を 3.9～9.2 の範囲に調節し，55°C に 22 時間液化してみた．その結果は Table 1 に示す通りである．また 100 g のマイワシの擂碎粥に n-塩酸と McIlvain 緩衝液とで pH を 2.7～4.6 の範囲に調節し，55°C に 17 時間液化した結果は Table 2 に示してある．之等の結果をみると，トルオールのような防腐剤を使用しなくとも可成り広い pH の範囲で安全な液化がみられた．また液化の最適 pH は余り顯著ではないが，液化後の pH で示すと 4.0～5.0 と 6.9～7.6 との二ヶ所にあることがわかる．即ち前者は主として Kathepsin 型酵素によるものであり，後者は主として Trypsin 型

Table 1. The effect of pH on the degree of liquefaction of sardine brei after 22 hrs at 55°C.

Toluol	−T§	+T	−T	+T	−T	+T	−T	+T	+T	+T
Initial pH	4.6		5.6		6.6		7.7		8.6	9.2
Final pH	4.9		5.7		6.2		6.9		7.6	—
Sol. N as % of T-N	74.0	62.3	71.7	58.2	67.0	58.9	74.2	65.5	66.8	68.5
Sol. N as % of TCA insol. N*	69.7	55.9	66.6	51.2	61.5	51.7	69.7	69.5	61.5	63.6

§ −T: no addition of toluol, +T: with addition of toluol.

* Nitrogen insoluble in 3% trichloracetic acid amounted to 85.6% of total nitrogen.

Table 2. The effect of pH on the degree of liquefaction of sardine brei after 17 hrs at 55°C.

Toluol	−T	+T	−T	+T	−T	+T	−T	+T	−T	+T
Initial pH	2.7		3.3		4.0		4.4		4.6	
Final pH	3.8		3.8		4.4		4.6		5.0	
Sol. N as % of T-N	70.6	64.5	75.0	66.2	78.5	73.0	78.5	72.5	76.5	74.0
Sol. N as % of TCA insol. N*	64.4	57.0	69.6	59.0	74.0	67.0	74.0	66.4	71.2	68.5

* Nitrogen insoluble in 3% trichloracetic acid amounted to 82.5% of total nitrogen.

のものによると考えてよい．なお17～22時間の消化では蛋白質の液化度は最高 74% に達し，見掛けの液化度は最高 79% であつた．またトルオールを加えると，いづれの場合にも液化度の減少を示した．

2．pH の時間的変化

液化に対する pH の影響を吟味中に注意されたことは，最初に調節した pH と加温後の pH とが可成り著しく変化する点である．従て安全な液化と腐敗との境界に相当する pH を求めるには，どの操作に於ける pH であると限定しないと正確を期し難い．依て液化初期に於ける pH の変化を測定してみた．

The 3. The change of pH during the liquefaction at 40°C.

cc. water added per 25 g sardine brei	44.5	45.0	45.5	46.5	47.5	48.0
cc. n-HCl added per 25 g sardine brei	5.5	5.0	4.5	3.5	2.5	2.0
Initial pH value	3.72	3.96	4.15	4.40	4.60	4.90
pH upon warming to 40°	4.38	4.53	4.58	4.87	5.17	5.33
pH at 1-hr liquefaction	4.80	4.63	4.72	5.07	5.31	5.50
pH at 2-hr 〃	4.61	4.72	4.84	5.12	5.38	5.50
pH at 3-hr 〃	4.73	4.77	4.94	5.12	5.37	5.54
pH at 21-hr 〃	4.66	4.77	5.63	6.42	6.81	6.67
Occurrence of spoilage	−	−	±	+	+	+

実験結果は Table 3 に示した通りで，pH 3.7～4.7 の範囲では最初に pH を調節した後，溫浴内で溫めて 40°C に上昇すると pH 値は急激に 0.7～0.4 上昇した．この現象は奥田，山藤両氏[7] が肉蛋白について認めた事実と一致する．しかし液化中にはその pH の上昇は少く，40°C の時の pH 値から 0.2～0.3 しか上昇しなかつた．勿論腐敗を起した場合には 1.1～1.6 の上昇がみられた．この表から明かなように，40°C では腐敗の危

險の限界は僅かに pH 0.2 の距りであるから，最初の pH の調節は加溫後の pH について精密に実施する方が安全である．

3．液化に対する溫度の影響

pH 4 と pH 8 附近に於て 40～70°C の範囲の溫度がイワシ魚体液化に対して如何なる影響を及ぼすかについて吟味し，Table 4 のような結果がえられた．いづれの pH の場合にも 50°C 附近に最適條件があり，これより溫度の上昇と共に液化度は減少するが，pH 8 の方が pH 4 より液化度の減少は少いのが観察される．なお，本実験に於ける液化度は

Table 4. The effect of temperature upon the degree of 17-hr liquefaction. §

pH \ Temperature	40°	50°	60°	70°
pH 4.0*	54.5	55.0	35.9	22.6
pH 8.0*	68.6	69.0	47.0	35.0

§ The reaction system: 130 g sardine brei plus 240 cc water plus 20 cc n-HCl; 130 g sardine brei plus 245 cc water plus 15 cc n-NaOH.

* Apparent degree of liquefaction

他の場合に比し劣つているのは，多分トルオールを添加した為だけではなく，操作し易くする目的から魚体粥を約3倍に稀釈したので，加熱による酵素の破壊が多かつた為ではないかと想像される．

4．pH–溫度関係が腐敗防止に及ぼす効果

Table 3 の結果から 40°C で液化の場合には pH 4.5 が腐敗の臨界であることがわかり，また Table 1 から 55°C で液化の場合には pH 5.7 迄安全に液化しうることがわかつた．

Table 5. The safety range of liquefaction obtained by the regulation of temperature and pH. The italic figures are pH's of spoiled cases.

cc water added per 25 g sardine brei	45.0	45.5	46.0	46.5	47.0
cc n-HCl added per 25 g sardine brei	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0
pH upon warming to 45°	4.62	5.17	5.37	5.53	6.05
pH at 20-hr liquefaction at					
40 ± 2°	5.26	6.16*	6.84*	6.99*	7.09*
50 ± 1°	5.42	6.44*	6.66*	6.65*	6.95*
55 ± 1°	5.34	5.54	5.82	5.99	6.34
60 ± 2°	5.30	5.51	5.96	6.14	7.11*

* All are spoiled.

従て温度と pH との組合せによつて腐敗防止の範囲を明示することができる筈である．依て pH は 4.6～6.0，温度は 40～60°C. の範囲で液化した後の pH を測定し，また腐敗臭を検したところ，Table 5 のような結果がえられた．この実験によつて pH-温度関係に於ける腐敗範囲が明らかとなつた．この結果は Wolf, Foster 両氏[4] が *Pseudomonas soiae* について，また木俣氏[8] が大腸菌等についてそれらの死滅温度に対する pH の影響をみた結果と類似している．更に多数の同様の実験を繰り返して得た値を図示すると，

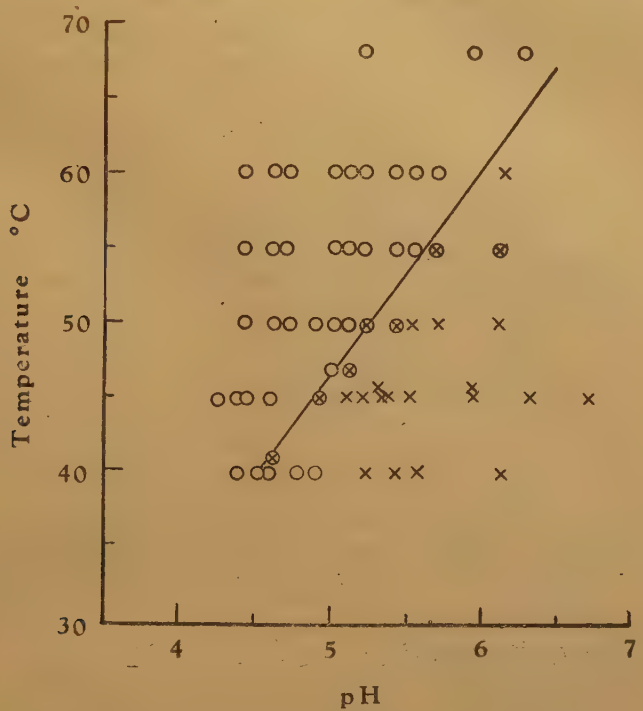


Fig. 1. Showing the effect of pH and temperature on the safety liquefaction. Liquefaction without spoilage, ○, with spoilage, ×, and with doubtful spoilage, ⊗.

Fig. 1 の如くなる．この図から腐敗と安全液化との臨界直線を概略求めると，pH 4.5 以上で温度 40°C 以上の範囲では次式により示される直線になる．

$$P_H = 0.08\,(T^\circ - 40^\circ) + 4.5 \cdots\cdots (1)$$

where, T°, temperature at which the liquefaction shall be carried out; P_H, pH value which is measured just after warming to T° at the start of the liquefaction and shows the highest limit value required for the safety liquefaction.

この式を用うると，安全液化の為の條件が容易に求められる．例えば液化しようとする pH を 5.0 に定めたい時には，液化温度を 46°C 以上に選ぶべきことがわかる．

5．液化に対する酸の種類及び食塩の影響

前項迄の研究には專ら塩酸を用いたが，鉄本氏の研究[9]によると同一 pH では無機酸より醋酸の方が防腐力は大であるから，塩酸と醋酸との比較を試みた．その結果は Table 6 に示す通りであつて，同一濃度或は同一 pH で比較した値は明に醋酸の方が塩酸よりも防腐力が強いことを示している．

Table 6. Effectiveness of acetic acid and hydrochloric acid to the prevention of spoilage as measured by increase in pH and volatile nitrogen.

No. of expt.		1		2		3		4		5		Control expt.**			
cc. n-acetic acid added§		8.0		6.0		4.0		2.0		0		8.0		0	
cc. n-HCl added§		0		2.0		4.0		6.0		8.0		0		8.0	
		pH	NH_3-N†	pH	NH_3-N	pH	NH_3-N	pH	NH_3-N	pH	NH_3-N	pH	NH_3-N	pH	NH_3-N
Time of liquefaction in hr	0	5.0	18.6	5.0	—	5.0	—	5.1	—	5.1	—	5.0	—	5.0	—
	3	5.0	19.6	5.1	23.3	5.2	23.3	5.3	24.2	5.5	23.5	5.0	26.4	5.2	24.8
	5	5.0	24.8	5.1	28.5	5.2	34.1	5.3	31.3	5.5	29.5	5.0	34.1	5.2	31.0
	7	5.2	31.0	5.2	34.1	5.2	34.7	5.5	41.0*	5.5	54.3*	5.0	34.1	5.2	32.6
	11	5.2	34.7	5.2	41.8*	5.2	46.5*	5.7	56.4*	5.8	289*	5.2	34.1	5.2	35.7

§ The volume of the acid added to the mixture of 50 g sardine brei and 100 cc water.

** With the addition of toluol.

* Smell of spoilage was noticed.

† mg Volatile basic nitrogen per 100 g fish brei.

次に食塩を用いて防腐しつつ液化する方法と著者等の方法とを比較する目的で，液化に対する食塩の影響を吟味した．その結果は Table 7，8 及び 9 に示してある．即ち 38°C

Table 7. The effect of sodium chloride on prevention of spoilage at 38°C.

Conc. of NaCl*	0 %	3.7 %				7.3 %			11 %		
pH at the start	4.5	6.0	5.5	5.0	4.5	6.0	5.5	5.0	6.0	5.5	5.0
pH at 24-hr liquefaction	7.4	6.6	6.4	6.2	5.8	6.2	6.0	5.6	5.8	5.5	5.0
Spoilage	+	+	+	+	±	+	+	±	−	−	−
Volatile basic N mg% filtrate	40	320	260	200	20	15	10	7	5	3	3

* This was calculated based on volume of water of fish brei plus added water.

Table 8. The effect of sodium chloride upon the prevention of spoilage and formation of amino acid-N at 50°C.

Conc. of NaCl*	0 %	3.7 %			7.3 %			11 %		
pH at the start	4.5	6.0	5.5	5.0	6.0	5.5	5.0	6.0	5.5	5.0
pH at 24-hr liquefaction	4.8	6.0	5.5	5.0	6.0	5.5	5.2	6.0	5.5	5.2
Spoilage	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Volatile basic N mg% filtrate	4	5	5	4	5	4	4	5	3	3
mg Amino acid-N per 100 cc filtrate	15	17	12	10	9	7	—	14	3	—

* This was calculated based on volume of water of fish brei plus added water.

Table 9. The effect of sodium chloride upon the degree of the liquefaction at 50°C and different pH's.

Conc. of NaCl	0 %		3.7 %		11 %	
pH at the start	4.5	6.0	4.5	6.0	4.5	6.0
pH at 16-hr liquefaction	5.0	6.5	4.5	6.2	4.8	6.0
Apparent degree of liquefaction	70.5	73.5*	42.0	—	42.3	65.8

* A small amount of toluol was added.

では食塩濃度 7.3 % 以下の場合 pH を低下させないと腐敗したが，50°C では食塩濃度 3.7 % 以下でも pH 6 迄は少くとも安全である．アミノ窒素の生成量についてみると，食塩を添加した場合に同時に pH を低下させると，殆ど常にアミノ酸生成量が減少し，この傾向は食塩濃度の高い程著しい．また同様のことはマアジの液化度に及ぼす食塩及び pH の影響を実験した結果（Table 9）にもみられる．即ち pH 4.6 附近で液化する場合に，食塩が加わると 3.7 % 程度でも液化率が著しく低下する．しかし pH 6 附近であれば，食塩の影響は比較的に少いようである．

大島氏[2] は魚醤油の製造に食塩濃度約 23 % を採用しているので，著者等の水素イオンの調節のみによる液化法に比べて液化度が低いことは確である．また鉄本氏[3] は食塩濃度 10 % と僅かの酸とを併用しているので，本研究の結果からみると明かに食塩によつて液化度は著しく低下する條件に相当している．従て著者等が決定した液化方法は従来のいづれの方法にも優つたものといえるであろう．

IV. 総　括

魚体の液化によつて漁獲物の高度利用を達成する目的で，水素イオンを魚体腐の防腐剤

並に液化酵素の作用促進剤として使用することを企て，防腐並に液化に共通な最適條件を探求した結果，次のような結果をえた．

1） 液化に対する水素イオンの影響を吟味したところ，液化に最適の pH は 4.0～5.0 と 6.9～7.6 の二ヶ所にあることを確かめた．

2） 粥状に擂砕した魚体に酸を加えて pH を調節した後，加温すると pH 値は急激に 0.4～0.7 上昇するが，それ以後は長時間放置しても 0.2～0.3 の上昇しかみられない．

3） 液化に対する溫度の影響をみると，50°C 附近が最適で，これ以上は溫度の上昇と共に液化度は減少する．

4） pH と溫度とを適当に調節することによつて，安全に液化しえられる範囲を決定することができた．また腐敗及び安全液化の範囲を決定する pH と溫度との関係を表わす実驗式を提出した．

5）安全な液化に対しては，塩酸よりも醋酸の方が同一 pH に於ても亦同一濃度に於ても，より有効であつた．

6）液化に対する食塩の影響をみると，pH 6.0 附近では 11 % の食塩は多少液化度を低下させる程度であるが，pH 4.5 附近では 3.7 % 程度の食塩でさえも液化度を著しく低下させることが認められた．

終りに，本研究の一部は日本農業研究所の補助金により支弁した．ここに厚く謝意を表する次第である．

文　　献

1） 富山哲夫，杉原　喬：「魚体の液化に関する生化学的研究」（予報）として水産学会（東京）に昭和17年4月講演発表．
2） 大島幸吉：農学，1，502（昭．22）．
3） 鉄本総吾：農産製造，2巻，11号，10頁（昭．23）．
4） Wolf and Foster : N.C. Agric. Sta., Tech. Bull., 20, 21 (1921).
5） 大谷武夫：水産学会報，5，1（昭．3）．
6） Tomiyama, T. : J. Biochem., 18, 285 (1933).
7） 奥田　譲，山藤一雄：日本農芸化学会誌，9，835 (1933).
8） 木俣正夫：日本水産学会誌，1，178（昭．7）．
9） 鉄本総吾：日本農芸化学会誌，9，388 (1933).

Résumé

In order to realize the efficient utilization of marine resources, the liquefaction of fish body as a whole has been studied by making use of hydrogen ion for an antiseptics, on one hand, and for an autolysis-promoting agent, on the other. Upon studying the optimum condition of hydrogen ion concentration and temperature for the liquefaction of fish brei or ground fish body, the following results have been obtained.

1） The two optimum pH's for the liquefaction was found; the one between

pH 4.0 and 5.0 and the other between pH 6.9 and 7.6 so far as the present experiment showed (Table 1 and 2).

2) The pH value of the fish brei which was adjusted at room temperature, was found upon warming up to 40～60°C. to rise abruptly by pH value of 0.4～0.7. A smaller change in pH value, however, was observed during many hours of the liquefaction (Table 3).

3) The optimum temperature was found about 50°C. The degree of liquefaction decreased with the rise of temperature in the range of temperature over 50°C. (Table 4).

4) The determination has been carried out of the safety range of liquefaction by an appropriate regulation of temperature and pH (Table 5). The presentation has been made of an experimental equation showing the interrelationship of temperature and pH which is of necessity for the safety liquefaction (Equation 1).

5) A more effective result to the prevention of spoilage was found by use of acetic acid than hydrochloric acid either at the same pH or the same level of concentration (Table 6).

6) It was clearly observed that at about pH 6 the addition of sodium chloride at 11% level lowered the degree of liquefaction to a certain degree, while at about pH 4.5 sodium chloride even at 3.7% level remarkably inhibited the liquefaction.

魚体の液化に関する生化學的研究

II. 魚体液化物のアオウキクサ成長促進効果について*

富山哲夫・米　康夫・石尾眞彌

Biochemical studies on the liquefaction of fish body

II. On the effectiveness of "solubilized fish" to the growth of a plant, *Lemna paucicostata* Hegelm.

Tetuo Tomiyama, Yasuo Yone and Shinya Ishio

緒　　言

魚肥は近年硫安の生産が增加したので，窒素肥料としての重要性を失ひつつある．しかし魚肥は施肥した場合に腐敗分解が適度に進行し，且つ土壤に腐蝕質を与えるため，水稻，果樹[1]に対しては化学肥料に比して肥効が大であるとされている．かような魚肥の肥効の原因はその窒素及び燐酸の含量及び分解速度のみによるのでなく，魚体の中に植物の成長を促進する物質が存在するためではないかとも想像される．

何となれば著者の一人（富山）は魚体の液化物が一般の細菌の発育を促進することを認め，特に *Coryn. diphtheriae, Strept. hemolyticus* のように普通培地に繁殖し難い菌の発育を促進することを確認したので[2]，植物体の発育にも有効な物質が恐らく存在するだろうと想像するに至つた．もしこの推察が正しければ魚体の植物成長促進物質のみを蛋白成分より分離し，前者は肥料に，后者は食糧として利用することが最も合理的利用法というべきであり，以下記載の研究によつて明かなように魚体液化法はその理想を具現させる一つの高度利用法と見做すことができよう．

かかる観察から先づこの有効物質の存在及び性質を知る必要があるので，本研究では試験植物として，従来肥効試験に用ひられ，培養容易で且つ明瞭な結果を与えると報告されている[3]アオウキクサ（*Lemna paucicostata* Hegelm.）を用ひた．第1報に報告した方法で調製した魚体液化物につき試験した結果は，魚体中にはアオウキクサの成長を促進する物質が存在することを明かにしたので，更に該有効物質の精製を試みた結果，該物質は微酸性で活性炭に吸着される有機物であることがわかつた．

なお，富山・米は肝臟の造血成分を結晶状に分離してビタミン B_{15}[4]と命名したが，この物質もまたアオウキクサの成長を促進する事実[5]から考えると，魚体に含まれる成長促進物質も恐らくビタミン B_{15} と同一或は類似物質ではないかと想像されるが，この点は更に研究を進めて近く報告したいと思う．

---

*九州大学農学部水産学教室業績．

魚体の液化に関する生化學的研究

II. 魚体液化物のアオウキクサ成長促進効果について

富山哲夫・米　康夫・石尾眞彌

Biochemical studies on the liquefaction of fish body

II. On the effectiveness of "solubilized fish" to the growth of a plant, *Lemna paucicostata* Hegelm.

Tetuo Tomiyama, Yasuo Yone and Shinya Ishio

九州大學農學部學藝雜誌 第十三卷 別刷
Reprinted from the Science Bulletin, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Vol. 13, Nos. 1~4, November, 1951

魚体の液化に関する生化學的研究

II. 魚体液化物のアオウキクサ成長促進効果について*

富山哲夫・米　康夫・石尾眞彌

Biochemical studies on the liquefaction of fish body

II. On the effectiveness of "solubilized fish" to the growth of a plant, *Lemna paucicostata* Hegelm.

Tetuo Tomiyama, Yasuo Yone and Shinya Ishio

緒　　言

魚肥は近年硫安の生産が増加したので，窒素肥料としての重要性を失ひつつある．しかし魚肥は施肥した場合に腐敗分解が適度に進行し，且つ土壌に腐蝕質を与えるため，水稲，果樹[1]に対しては化学肥料に比して肥効が大であるとされている．かような魚肥の肥効の原因はその窒素及び燐酸の含量及び分解速度のみによるのでなく，魚体の中に植物の成長を促進する物質が存在するためではないかとも想像される．

何となれば著者の一人（富山）は魚体の液化物が一般の細菌の発育を促進することを認め，特に *Coryn. diphtheriae*, *Strept. hemolyticus* のように普通培地に繁殖し難い菌の発育を促進することを確認したので[2]，植物体の発育にも有効な物質が恐らく存在するだろうと想像するに至つた．もしこの推察が正しければ魚体の植物成長促進物質のみを蛋白成分より分離し，前者は肥料に，后者は食糧として利用することが最も合理的利用法というべきであり，以下記載の研究によつて明かなように魚体液化法はその理想を具現させる一つの高度利用法と見做すことができよう．

かかる観察から先づこの有効物質の存在及び性質を知る必要があるので，本研究では試験植物として，従来肥効試験に用ひられ，培養容易で且つ明瞭な結果を与えると報告されている[3] アオウキクサ（*Lemna paucicostata* Hegelm.）を用ひた．第1報に報告した方法で調製した魚体液化物につき試験した結果は，魚体中にはアオウキクサの成長を促進する物質が存在することを明かにしたので，更に該有効物質の精製を試みた結果，該物質は微酸性で活性炭に吸着される有機物であることがわかつた．

なお，富山・米は肝臓の造血成分を結晶狀に分離してビタミン B_{15}[4] と命名したが，この物質もまたアオウキクサの成長を促進する事実[5] から考えると，魚体に含まれる成長促進物質も恐らくビタミン B_{15} と同一或は類似物質ではないかと想像されるが，この点は更に研究を進めて近く報告したいと思う．

---

* 九州大学農学部水産学教室業績．

実　驗　方　法

農学部附近の溝の中に簇生しているアオウキクサを採取し，数日間春日井水耕液[6]或は New Jersey 農試水耕液[7]の改変せるもの[3]（改変 N. J. 液と略記する）に前培養して，試験にはその中の四枚葉のもののみを用ひた．300 cc 容のビーカーに入れた水耕液 100 cc に各種試料を添加し，対照には試料中の窒素と同量の窒素を硫酸アンモニヤ或は硫酸アンモニヤと硝酸カルシウムとの混液の形で補添して，日中日光の照射の充分な実驗室の窓際か或は温室内で 18～20 日間培養し，葉の增加数（実驗后の葉数と開始時の葉数との差）及び実驗終了后の乾葉重量を測定して成長促進効果を判定した．

なお培養液は 2 日目毎に取換えて細菌による影響のないように心がけた．春日井水耕液及び改変 N. J. 液の組成を示すと，次の通りである．

春日井水耕液			改変 N. J. 液		
$(NH_4)_2SO_4$	189	mg/L	K_2HPO_4	310	mg/L
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	101	mg/L	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	1060	mg/L
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	30	mg/L	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	510	mg/L
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	16	mg/L	$(NH_4)_2SO_4$	100	mg/L
KCl	48	mg/L	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.83	mg/L
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	3.4	mg/L	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.83	mg/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.25	mg/L			

実驗結果及び考察

(1) 魚体液化物の発育促進効果

土屋・今井両氏[3]はアオウキクサを春日井水耕液及び改変 N. J. 液で培養した結果，后者が良好な発育を示したと報告している．著者等は両氏の結果を追試すると共に，アオウ

Table 1. The effectiveness of the solubilized fish to the growth of the plant. (Date of experiment: June, 1945).

Kinds of culture media	Kasugai				Modified New Jersey			
No. of Experiment	Cont.	No. 1	No. 2	No. 3	Cont.	No. 1	No .2	No. 3
Added amt. of inorganic N* expressed as per cent of T-N	4	3	2	0	4	3	2	0
Added amt. of sol. fish -N expressed as per cent of T-N	0	1	2	4	0	1	2	4
Increase in number of leaf §	13	14	19	16	21	20	26	30
Weight of dry leaf (mg)	3.1	3.4	4.0	4.1	6.7	7.2	7.6	10.9

* as a mixture of ammonium sulfat and Ca nitrate.

§ 18-day culture.

キクサの成長に及ぼす魚体液化物の効果に就て実験した.

実験に供した魚体液化物はマイワシを擂砕后, 40% の湯と適量の塩酸とを加えて微酸性にし, 約 50°C に数時間放置后濾過し, 濾液をとり中和し, 次に減圧濃縮したものであつて, 全窒素は 10.0% であつた. 液化物及び無機窒素源を Table 1 に示すように, 春日井水耕液及び改変 N. J. 液の全窒素に対し 0, 1, 2, 4% に相当する窒素量だけ添加したものに18日間培養した. Table 1 及び Fig. 1 に示した葉の増加数及び葉の乾燥重量によつて成長度を判断すると, 魚体液化物の示す成長促進効果は, この実験の添加量の範囲では添加量に比例して増大している. 但し添加量が多くなると, この試験では水温が高かつたし, 又培養液を 2～4 日毎に取換えたため, 2日目以后には甚しい細菌の混濁が認められ, その為に有効成分は腐敗消耗されるようにみえた. 例えば春日井水耕液の No. 3 のように余り効果が現れなかつたのは前記の原因と思われる. また土屋・今井両氏の研究結果と同様に春日井水耕液より改変 N. J. 液の方が成長がよかつたので, 以下の実験にはすべて改変 N. J. 液を用いた.

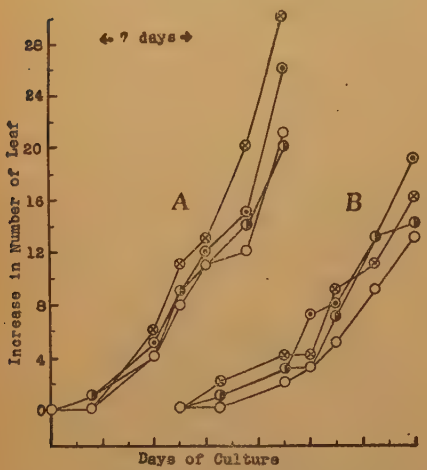


Fig. 1. Rate of growth of the plant supplemented with solubilized sardine.
A: New Jersey culture media
B: Kasugai culture media.
The control, ○; 1% of Total N supplied by sol. sardine, ◑; 2% of Total N, ⊙; 4% of Total N, ⊗.

(2) 魚体液化物中の灰分, 細菌による分解物及び活性炭吸着物の効果

前項の研究の結果, 魚体液化物にはアオウキクサの成長を促進する物質を含有することが明かとなつたが, 該有効物質は魚体液化物中に含まれる有機物か, 無機物か, 或ひは培養中繁殖する細菌の生産物なるかを確認することは本研究を展開する上に重要なので, 魚体液化物, 液化物中の灰分, 及び大腸菌による分解物を改変 N. J. 液に Table 2 に示すような割合に添加した場合の効果を比較してみた. なお有効物質は活性炭に吸着されるか否かを知る目的で, 使用魚体量の 0.5 % に相当する活性炭を液化物の 10 % 溶液に加えて pH 4.5 で吸着し, 吸着した活性炭を水洗后, 苛性ソーダで溶出した精製区分の効果をも試験してみた.

試験区には改変 N. J. 液の全窒素の 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 % に相当する窒素を含む魚体液化物及び活性炭吸着物を, 又前記窒素量に相当する魚体液化物より得た灰分, 並びに大腸菌による分解物を水耕液に加え, 対照区には硫酸アンモニヤを前記窒素量に相当するだけ加えて比較した. なお実験に供した魚体液化物はカレイを (1) 項に記載した方法で処理して得たものであり, 灰分は魚体液化物の上記添加量を灼熱燃燒したものの水溶性区分であり, 大腸菌による分解物は同量の液化物に大腸菌を移植し 35°C で数日間充分に繁殖させたものである.

実験結果は Table 2 に示すように活性炭吸着物が最も効果があり，灰分，大腸菌による分解物は多少の効果を示したが，活性炭吸着物ほどの効果を示さなかつた．従て本有効物質は微酸性で活性炭に吸着される有機物とみなすことができる．

Table 2. The effectiveness of the ash of solubilized flat fish, the product formed by *E. coli*, and the adsorbed fraction by the carbon.
(Date of experiment : Oct. 1949).

Increase of N-level per cent of T-N of media	2.5			5.0			7.5			10.0		
Kinds of added matter	mg sample per L.	Increase in number of leaf	mg dry leaf at end of expt.	mg sample per L.	Increase in number of leaf	mg dry leaf at end of expt.	mg sample per L.	Increase in number of leaf	mg dry leaf at end of expt.	mg sample per L.	Increase in number af leaf	mg dry leaf at end of expt.
$(NH_4)_2SO_4$	17.5	13	4.3	35	9	2.9	52.5	14	5.1	70	11	4.0
Solubilized fish	27	15	6.5	54	12	5.3	81	13	5.2	108	12	4.6
Ash	4.6§	12	5.8	9.2	15	6.1	13.8	19	6.0	18.4	15	5.7
Products by *E. coli*	—	—	—	54**	15	4.4	81	16	5.6	108	13	4.6
Adsorbed fraction	56	16	5.3	112	20	7.5	168	21	7.8	224	19	7.7

§ Water soluble ash obtained from 27 mg solubilized fish was used.

** The product by *E. coli* used has been prepared by the following procedure; a solution containing 54 mg sol. fish was inoculated with *E. coli* and kept at 35°C for several days. The dry matter was not determined, but assumed no change to take place as a whole.

* 16-day culture.

（3） 魚体液化物，活性炭吸着物及び活性炭非吸着物の効果

（2）項に示した実験の結果，魚体液化物に含まれるアオウキクサの成長促進物質は，魚体液化物中の或る種の有機物であつて，活性炭に吸着されることが明かとなつた．しかし活性炭に吸着されない物質に就ては探究しなかつたので，この実験に於てはイワシを（2）項に記した方法で定量的に処理して得た活性炭吸着物及び活性炭によつて吸着されない部分に就て実験した．

a）（1）及び（2）項に示した研究に於ては，液化物を多量に添加したので細菌の繁殖が甚しく，水耕液が多少腐敗したため，その効果が明瞭でない結果を示した．また各試料は窒素を基準として同率に添加したため，窒素含量の少い活性炭吸着物は乾燥物量として多量添加したことになつたので，本実験に於ては各試料の添加量を減少してみた．即ち改変 N. J. 液の全窒素に対し 0.3 % に相当する窒素を含む液化物 3 mg，及び硫酸アンモニヤ 2 mg をそれぞれ液化物区及び対照区の 1 L に添加し，他方活性炭による吸着物区及

Table 3. The analytical data of the samples.

	Solubilized Sardine	Adsorbed fraction	Non-adsorbed fraction
Dry matter (%)	70.7	81.5	62.3
Total N of wet matter (%)	8.3	6.0	4.9

Table 4. The effectiveness of solubilized sardine, adsorbed and non-adsorbed fraction. (Date of experiment : Sept. 20～Oct. 10, 1950).

	Control		Solubilized sardine	Adsorbed fraction		Non-adsorbed fraction	
mg dry matter added per L.	2		3	0.75		1.9	
Added amt. of N as per cent of T-N	0.3		0.3	0.03		0.1	
Increase in number of leaf §	14	12	16	26	18	12	10
mg dry leaf at end of expt.	3.1	2.9	3.2	5.2	3.8	3.0	2.6

§ 20-day culture.

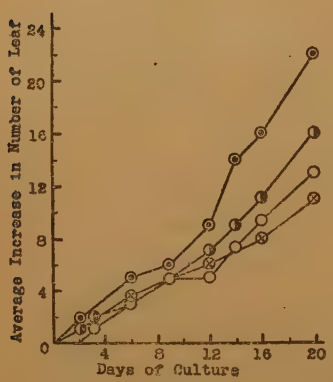


Fig. 2. Rate of growth of the plant supplemented with solubilized sardine, adsorbed and non-adsorbed fraction.
The control, ○; 0.3 % of Total N supplied by sol. sardine, ◑; 0.03 % of T-N supplied by adsorbed fraction, ⊙; 0.1 % of T-N supplied by non-adsorbed fraction, ⊗.

び非吸着物区には液化物3 mg より得た活性炭吸着物 0.75 mg 及び非吸着物 1.9 mg を添加し，22～35 °C の溫室内にて培養試験した．なお之等の試料の組成は Table 3 に示す通りである．実験の結果は Table 4 及び Fig. 2 に示すように，魚体液化物の成長促進効果は活性炭吸着物区に主としてみられ，非吸着物区には全くみられない．

b）次ぎに單位重量当りの効果を知る目的で，イワシ魚体液化物，活性炭吸着物及び活性炭非吸着物を改変 N. J. 液1 L に乾燥物として2 mg 宛添加してその成長促進効果を比較した．但し対照区には魚体液化物2 mg 中の窒素と同量の窒素を含む硫酸アンモニヤ量即ち1 mg を添加して 24～34 °C の溫室内で 18 日間培養試験した．使用した試料の分析結果は Table 5 に示す通りである．

実験結果は Table 6，Fig. 3 及び Fig. 4 に示すように，活性炭吸着物区は対照及び活性炭非吸着物区に比し成長がよかつた．しかし本実験に用いたアオウキクサは約2ヶ月間

Table 5. The analytical data of the samples.

	Solubilized sardine	Adsorbed fraction	Non-adsorbed fraction
Dry matter (%)	69.9	77.1	68.9
Total N of wet matter (%)	6.7	4.7	4.6
Ash of wet matter (%)	11.4	23.5	12.9
NaCl of wet matter (%)	2.7	6.0	2.7

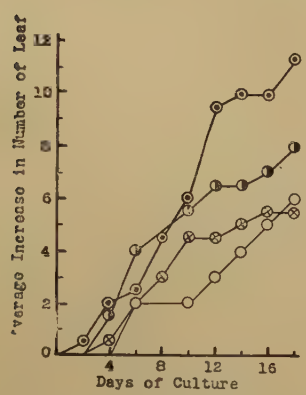


Fig. 3. Rate of growth of the plant supplemented at dry matter level with solubilized sardine, adsorbed and non-adsorbed fraction.
The control, ○; 2 mg/L sol. sardine, ◑; 2 mg/L adsorbed fraction, ⊙; 2 mg/L non-adsorbed fraction, ⊗.

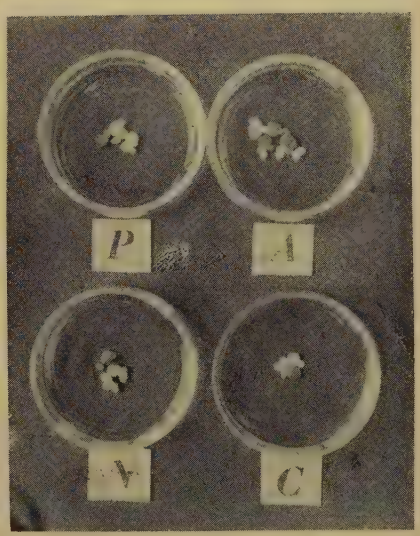


Fig. 4. Showing relative effectiveness of various samples.
P····A solubilized sardine 2 mg/L
A····Fraction adsorbed by an active carbon 2 mg/L
N····Non-adsorbed fraction 2 mg/L
C····Control (New Jersey culture media)

Table 6. The effectiveness of solubilized sardine, adsorbed and non-adsorbed fraction. (Date of experiment: Oct 28～Nov. 15, 1950).

	control	Solubilized sardine		Adsorbed fraction		Non-adsorbed fraction	
mg dry matter added per L	1	2		2		2	
Added amt. of N as per cent of T-N	0.13	0.13		0.08		0.08	
Increase in number of leaf §	6	8	8	9	14	5	6
mg dry leaf at end of expt.	2.2	2.7	2.8	2.9	4.3	2.1	2.3

§ 18-day culture.

改変 N. J. 液に培養したもので，天然のものに比して形が小さく，色も薄いものであつたし，また実験中曇天が続いたためか，全般に成長が悪く，a）項の実験結果ほどの差が出なかつたようである．

摘　　要

1） 魚体液化物にはアオウキクサの成長を促進する有効成分を含有する．
2） 魚体液化物中の植物成長促進物質は活性炭に吸着される有機物である．
3） 活性炭吸着1回の濃縮物は水耕液1L中 0.75 mg 以上で顕著な効果を示した．

終りに，本研究の示唆を与えられた盛永俊太郎博士，種々御教示を賜つた本学瀬川，山田両助教授，ならびに培養試験に助力された井出克己，吉田武両氏等に深謝の意を表する．

引 用 文 献

1） 大島幸吉：魚粉と魚粕 pp 386, 389（昭．13）．
2） 富山哲夫：1949年4月東京に於ける水産学会年会にて発表．
3） 吉村フジ：植物学雑誌 55（1941）163, 同誌 57（1946）371, 同誌 59（1947）1, 同誌 63（1950）279.
土屋靖彦，今井貞彦：日本農芸化学会誌 19（1943）279.
4） 富山哲夫，米　康夫：1949年10月熊本に於ける日本農芸化学会西日本支部例会にて発表．
5） 富山哲夫，米　康夫：1950年10月長崎に於ける日本水産学会九州支部大会にて発表．
6） 春日井新一郎，小西千賀三：科学，6（1936）512.
7） Ellis, C. and Swaney, M. W.: Soilless growth of Plants (1938) 145.

Résumé

The present paper deals with the growth-promoting effect of "solubilized fish" and its active ingredient upon the growth of a plant, *Lemna paucicostata* Hegelm.

The solubilized fish used has been prepared by the following procedure. A ground fish body after being acidified at pH 4.0 ～ 4.5, was subjected to autolysis at 50°C. The liquefied part was separated from the residue by filtration and then neutralized.

The concentration of the plant growth factor in the solubilized fish has been attempted and realized by the following procedure. The solubilized fish solution after its pH being adjusted at 4.5, was shaken with the active carbon for 30 min. and filtered. The active factor was eluted with a dilute solution of sodium hydroxide.

It has been shown that the solubilized fish is effective to the growth of the plant (Table 1 and Fig. 1). The growth factor is not an inorganic matter and seems not to be a secondary product formed from the solubilized fish by bacteria during the culture (Table 2). The data presented here show that the fraction adsorbed by the active carbon is very effective to the growth of the plant, whereas the non-adsorbed fraction remains ineffective (Table 4 and 6; Fig. 2, 3 and 4).

肝臓の造血成分に關する研究　(第1報)
Phenylhydrazine 貧血による造血効力の測定法について*

米　康夫・富山哲夫
(九州大学農学部　水産化学教室)

Studies on Antianaemic Ingredients of the Liver
I. On the Method for the Estimation of Antianaemic Potency by the Phenylhydrazine-anaemia.

Yasuo YONE and Tetsuo TOMIYAMA

A modification of Erdös method has been made of the method and amount of administration of phenylhydrazine hydrochloride. A comparison between intravenous administration and intraperitoneal one showed that the latter way of administration gave a consistent time-period for the minimum red cell count (Table II). The administration of thirty mg phenylhydrazine hydrochloride per kg body weight which usually resulted in decrease of 50 to 70 per cent in red cell count, was adopted since its variation during the daily consecutive sampling of the blood over nine days was found within the range of 80 to 106 per cent (Table I).

The reliability of the present method for the estimation of the antianaemic potency in the liver has been discussed. The data obtained for the commercial liver-preparations (Table III) and some discussions on discordant data reported in the literatures led to a conclusion that the method employed could be esteemed to have the appreciabe reliability.

I. 緒　　言

1926 年 Minot, Murphy 両氏[1] が悪性貧血に対する肝臓の顕著な治癒効果を報告して以来，肝臓の抗貧血因子の研究は生化学者の注目を集めた。次で Castle[2] 氏は 1929 年に抗悪性貧血因子は胃液中の内在因子と食物中の外在因子との相互作用によつて生ずることを確認し，更に肝臓がこの有効成分を貯蔵していると推定されるに至り，有効成分の単離への努力が多数の研究者により活発に展開された。そして各方面からの研究，例えば山羊乳貧血，微生物の生長因子，雛の生長因子等に関する研究の成果が集積して，遂に酵母[3]，ホウレンソウ[4] 等から既に分離されていた化合物，即ち Folic acid によつて悪性貧血の治療ができることが発見されるに至つた。しかし Folic acid には悪性貧血時の脊椎神経症状を治癒しえない不満足があつた。1948 年に至り Rickes 氏[5]，Smith 氏[6] 等は悪性貧血症状を完全に治癒できるビタミン B_{12} を多量の牛肝臓より分離することに成功した。なお最近にはこの外に抗貧血性のビタミン B_{14} の存在が提唱され，造血有効因子の多元性が次第に明瞭となつてきた。

他方，血液の造成に有効な成分が牛[7] 馬[8] 鶏[9] 等の溫血動物のみでなく，もし魚類等の冷血動物肝臓にも多量含有されるのであれば，畜産資源に乏しいわが国に於ては造血因子の純化單離の研究には勿論更に肝臓を食品の強化や医薬等に利用するに当つても，多量の資源を動員することができるであろう。著者等はかような見地から，肝臓特に水産動物肝臓中の造血成分の含量，純化，単離等に関する研究に着手した。

* 1947 年 6 月　農芸化学会西日本支部例会 (福岡) に於て発表した
昭和 25 年 7 月 24 日受理

しかし本研究を展開するためには，先ず造血効果を検定する方法について充分に吟味する必要がある。今迄に提出された方法としては，悪性貧血患者の臨床試験によるもの[9]，山羊乳貧血或は牛乳貧血の治療試験によるもの[10]，瀉血貧血恢復試験によるもの[11]，白鼠網状赤血球反応の増加によるもの[12]，赤血球の酸素消費量の増強効果によるもの[13]，Phenylhyldrazine 貧血（以下 ph-hydz. 貧血と略記す）に対する拮抗試験によるもの[14][15]等がある。之等の内で臨床試験によるもの以外の方法については，いずれも賛否両論がある。しかし Erdö˙ 法[15]は比較的簡単に実施し得られるので，本法が抗貧血効果の検定法としてどの程度の信頼度をもつかについて，文献を吟味してみた。大岡氏[16]は詳細な追試の結果，多大の疑問があると主張しているが，佐々木氏等[7]が白鼠を用いて Erdös 法を採用し，肝臓より分劃した種々の区分の効力を検定した結果によると，既往の文献に照し抗貧血効果があると思われる區分は常に陽性となつている。

依て著者等は先ず Erdös 法の基礎条件を白鼠を用いて吟味し，原法に多少の変改を加えた。次にこの変改法によつて独乙製 Campolon（和名 Nagravon）及び米国製 Liver liquid parenteral の造血効力の判定を行つたところ，大岡氏が得たような不確定な値は全く得られなかつた。それで既往の各研究者の data を詳細に検討し，大岡氏の異常値についても論議を行つた。その結果，本法は造血効力の判定法として相当の信頼度をもつものと結論した。

II 実 験 の 部

A. 連日採血による赤血球数の変化

白鼠の尾部より毎日採血するので，その刺戟によつて赤血球数にどの程度の変動があるかについては佐々木氏等[7]の研究があるが，抗貧血効果を判定するに当つて重要な点であるから，著者等も繰り返し測定してみた。採血は白鼠尾部の靜脈を小刀の尖端又はカミソリの刃を用いて傷つけて湧出させる方法によつた。なお赤血球数は Thoma-Zeiss の Hämatitometer を用いて算定し，1 cmm 中の赤血球数を以て示した。Table I に明かなように，赤血球数の変動は少く概ね 88～103 % にあるが，佐々木氏等の場合より多少大きく，最高 106 %，最低 80 % であつた。

Table I　*The change of red blood cell count during the consecutive daily sampling of the blood.*

Day of sampling	R. B. C.	Variation in R. B. C.	R. B. C.	Variation in R. B. C.
	million	per cent	million	per cent
0	7.60	100	8.00	100
1	—	—	6.92	88
2	7.87	103	6.39	80
3	7.41	97	—	—
4	7.94	104	6.76	85
5	—	—	—	—
6	6.40	84	7.05	88
7	6.72	88	6.81	85
8	—	—	—	—
9	8.13	106	7.17	90
Albino rat Sex	♀		♀	
Albino rat Body wt.	176		192	

B. Ph-hydz. の注射方法及び注射量

佐々木氏等[7]は ph-hydz. の注射量によつて血球の減少度を異にすることを確めた後，ph-hydz. HCl は白鼠の体重 1 kg につき 10～15 mg を皮下注射し，供試品は経口的に或は皮下注射により 2 日間投与する条件を採用している。

著者等は Table I に示したように連日採血のみで赤血球数に多少の変動があることを知つたので，検定結果を判然させるには多量の ph-hydz. を投与して血球数の最低値及び減少率を明瞭ならしめるべきものと考え，ph-hydz. 量につき再吟味を行つた。即ち白鼠体重 1 kg につき ph-hydz. HCl の 15, 20 及び 30 mg に相当する溶液* をそれぞれ白鼠の腹腔内に注射後，赤血球数の最低に達する日数を検し，また尾部静脈に注射した場合をも比較してみた。その結果は Table II に明かなように，血球数

Table II *The effect of injecting method and amount of phenylhydrazine HCl upon the change in red blood cell count (million per cmm)*

Method of injection		Intravenous				Intraperitoneal									
Amt. injected mg/kg body wt.		15		15		15		20		30		30		30	
Albino rat	Sex	♀		♀		♀		♀		♂		♀		♀	
	Body wt.	55		40		45		154		80		74		168	
Before injection		9.65	% 100	9.80	% 100	9.04	% 100	8.61	% 100	9.90	% 100	9.91	% 100	9.90	% 100
Days elapsed after injection	1	7.92	82	8.98	92	8.26	91	7.54	88	9.35	95	9.80	99	8.80	89
	2	5.97	62	8.39	86	7.59	84	7.47	87	7.87	79	8.18	83	8.64	87
	3	7.56	78	8.37	85	7.18	79	6.00	70	6.82	69	7.23	73	5.55	56
	4	8.36	87	9.88	101	7.94	88	6.45	75	6.20	63	8.20	83	6.64	67
	5							7.46	87	7.15	72			8.33	84
Day at minimum r. b. c. count.		1.9		2.7		2.9		3.0		3.6		3.0		3.1	

の最低に達するまでの日数は，腹腔内に注射した場合には，Erdös 氏，大岡氏，佐々木氏等の結果と比較して殆ど近似している。しかし靜注の場合には，腹腔内注射よりも技術的に困難であり，また最低に達する日数に変動がある。ph-hydz. 注射後の赤血球減少率は，佐々木氏等の結果と同様に，注射量に正比例する。それ故に本法による結果を確実且明瞭にするためには，白鼠体重 1 kg 当り ph-hydz. HCl 30 mg を腹腔内に注射する条件を最適と認めた。

C. 市販肝臓製剤の造血効力の判定

Ph-hydz. 貧血に対する市販肝臓製剤の効力については多数の研究がある。市販製品としては Campolon, Pernämon, Hepatrat 等が用いられたが，同一製品を用いた場合でも研究者によつて結果が一致していない。従つて著者等は以上吟味した Erdös 法の変改法を用いて，独乙 Bayer 製の Campolon（和名 Nagravon）及び米国 Armour 会社の Liver liquid pareteral (U. S. P. 単位 4) の効力を判定してみた。

その結果は Table III に示すように，血球数最低日は対照區 3.6 日に対し試験區は 4.9～6.5 日に遷延した。しかも米国製品にみられるように，遷延度は明かに投与量に比例する。但しこの現象は恐らく或濃度範囲にのみ見られるもののようである。もし更に多量の造血成分を与える場合には，大岡氏

* Ph-hydz. 溶液としては，0.120 g 塩酸塩を 5 cc の蒸溜水に溶解し，10 % Na_2CO_3 の約 16 滴で中和して ph 6.8 とし，之を 10 cc に定容したものを用いた

Table III *The effectiveness of commercial liver-preparations upon the change in red blood cell count (million per cmm).*

Name of preparation	Campolon or Nagravon			Liver liquid parenteral					Control	
Dilution	1/15			1/20		1/40				
Amount of diluted sample administered per kg body wt.	3 cc			2 cc		2 cc				
Body wt. of rat	127	138	156	182	162	198	140	148	134	104
Before injection	8.94	8.60	8.80	9.70	8.38	9.27	8.22	9.26	8.85	9.12
Days elapsed after injection 1	7.79	8.35	6.55	9.29	9.49	7.89	7.42	8.06	7.97	6.81
2	7.22	6.82	—	6.19	7.26	7.61	6.71	6.48	7.01	6.15
3	6.99	6.23	5.77	4.95	6.07	5.61	5.90	5.20	6.40	4.75
4	6.59	—	5.44	4.74	5.64	5.30	5.30	4.70	4.81	6.35
5	6.01	5.96	5.41	4.50	5.30	4.20	4.46	4.43	5.72	6.12
6	5.98	5.16	4.17	3.82	4.31	6.07	5.65	5.15	6.03	6.51
7	6.08	5.72	4.37	4.40	4.54	6.52	6.30	5.89	—	6.60
8	6.78	6.66	5.90	5.14	4.78	6.64	6.88	6.82	—	—
9				6.08	7.55	7.94	8.61	7.44	—	—
Day at minimum r. b. c. count	6.0	6.2	6.5	6.0	6.5	5.0	5.1	4.9	4.1	3.1

の data に屢々みられるように，貧血が極めて軽度で，赤血球数の最低日は寧ろ対照區よりも小であつて，直ちに恢復に向うようである。この傾向は著者等もまた Promin 貧血の研究で屢々観察した。

IV. 論　　考

肝臓の抗貧血効果の検定に本試驗法が適用し得るや否やの決定には，葉酸，ビタミン B_{12} のような単離した抗貧血成分が，はたして ph-hydz. 貧血に拮抗作用を示すや否やを研究する必要がある。かような研究が未だ発表されていない現状では，本法の信頼度は既往の研究に於て，悪性貧血に有効或は無効とされている區分が，本法により陽性或は陰性と現われるかによつて判定されている。

Ph-hydz. 貧血と肝臓の抗貧血成分との間に拮抗作用が存在するや否やについては，研究者によつて甚しく一致を欠いている。例えば Jastrowitz, Neidhardt 両氏[17]，Rusznyak, Engel 両氏[14]，Erdös 氏[15] はこの拮抗作用を確認し，Friedländer, Steinitz 両氏[18] も弱い作用を認めている。特に Rusznyak, Engel 両氏は予め肝臓エキスを三日間皮下注射した犬に ph-hydz. を投与した後，毎日赤血球数の減少率を算出して拮抗作用を求め，ph-hydz. の 20 mg に拮抗する有効物質の効力を一単位とすることを提唱し，Erdös 氏は ph-hydz. 貧血の赤血球数最低日が遷延した時を有効と判定する方法を提出している。しかし Strisower 氏[19]，Adlersberg, Gottsegen 両氏[20]，Heath 氏[21]，Paschkis, Taylor 両氏[22]，大橋，橋本両氏[23]，大岡氏等[16] はいずれも否定的結論を発表している。

さて之等の結論を詳細に検討してみると，必ずしも皆否定的ではない。Strisower 氏の結果では，肝臓粉末を投与した犬に 4 日間毎日 ph-hydz. を注射すると，赤血球数は 42.6% と減少するが，対照區の 34.5% に対し多少の拮抗作用が認められる。しかし同氏は対照區の犬が若いために鋭敏に反応したためであると解釈している。また同氏は Toluylendiamin や Hämolysin による貧血には，肝臓粉末が顯著な拮抗作用を示すのを確認している。Adlersberg, Gottsegen 両氏は家兎に 5～7 日間毎日体重 1 kg 当り 7.5～10 mg ph-hydz. を注射し，他方体重 1 kg につき 30～100 g 生肝相当量

の hepatrat を 30 日間毎日経口投与した実験では，最低に達する日数は対照區と大差ないが，肝臓投与區では赤血球数の恢復がかなり早い。以上のように ph-hydz. の多量投与の場合でさえも，肝臓の効果が確かに認められる。Paschkis, Taylor 両氏は Rusznyak, Engel 法に從い家兎を用い，Pernämon（生肝 1000 g 相当）を三日間注射して後，ph-hydz. を一回注射したところ，対照區と差がなかつたと記載しているが，詳細な data を示していない。しかし Saponin 貧血に対しては Pernämon の著効を認めている。Heath 氏は ph-hydz. 貧血家兎に 2 cc の Campolon を 8～11 日間毎日注射しても，血球の新生，貧血の出現には変化がなかつたと報告しているが，ph-hydz. 注射量その他の data は記述されていない。かような研究には ph-hydz. 及び Campolon の投與量を変化してみないと肝製剤の無効を主張し難いと思う。このように既往の data を検討してみると，詳細な結果が記述されてない Heath 氏，Paschkis, Taylor 両氏の報告を除いては，肝臓の効果は陽性とみて差支えない。

次に Erdös 法に対する批判を検討してみよう。先ず Erdös 氏の用いた精製肝製剤を生肝臓量に換算してみると，体重毎 kg 10～15 mg の ph-hydz. HCl の投與の場合には，体重毎 kg 8.6 g の生肝相当量を一回注射すると貧血抑制効果が見られるが，5.2 g 以下では無効となつている。Erdös 法を追試した大橋，橋本両氏の結果をみると，家兎に体重 1 kg につき 16 mg ph-hydz. を與え，他方 Reimann 法で調製した肝臓エキスの経口投與を毎日継続した結果，体重 1 kg 当り 5 g の生肝相当量では無効であるが，10 g 生肝相当量では赤血球数の最低日を僅かに延長している。更に Erdös 法の信頼度については，大岡氏の詳細な研究がある。同氏は家兎を用いて，生肝臓或は肝製剤の 70% アルコール抽出残渣即ち無効と思われる區分を経口投與して貧血に対する拮抗作用を検したところ，Erdös 氏の結果と趣を異にし，赤血球数の減少はないか或は減少しても僅少であつて直ちに恢復し，強い拮抗効果を認めた。また無効と思われる骨炭吸着濾液 K_3 も有効性を示した。他方，強力な効果が期待される試料，例えば Subbarow 法によつて得た Fraction I，国産肝製剤の 70% アルコール抽出液，独乙製肝製剤 N には拮抗作用が認められなかつた。依て同氏は中毒貧血に対する拮抗性物質は悪性貧血に対する有効物質とは別個のものであろうから，本法には実用的価値がないと断じている。

しかし大岡氏の実験を詳細に検討してみると，国産肝製剤の 70% アルコール抽出残渣並に生肝臓の 70% アルコール不溶部或はその水解物が有効と現れたのは，供試料の多量（体重 1 kg 当り生肝臓 54 g 相当量）を経口投與しているので，胃で有効物質が生成したためとも考えられる。Fraction K_3 が有効であつたのは，著者等の研究* によると，活性炭の種類により有効成分の吸着度にかなりの差があるから，吸着濾液に有効成分が残つたためとも説明される。また Fraction I が無効であつたのは，この種の研究によくみられるように，この區を得る迄に精製の複雑な行程を経ているので，有効成分の損失が多かつたのではないかと推察される。たゞ肝製剤の 70% アルコール抽出液及び独乙の肝製剤 N は無効であつたとの実験結果は説明できない。しかし著者等の研究では Table III に明かなように，Nagravon 及び Liver liquid parenteral はいずれも血球数最低日の顯著な遷延効果が認められたので，大岡氏の結果はいかなる原因のためか理解し難い。

他方，著者と同様に白鼠を用いて Erdös 法により肝臓有効成分の検索を行つた佐々木氏等[7] の結果をみると，生肝臓の水或は 70% アルコール可溶部，燐タングステン酸沈澱部，活性炭吸着部等の抗悪

---

* 同じ牛肝抽出液を市販活性炭（T.）で吸着した場合には，生肝 1 g 当り造血単位 1.0 を示したが市販活性炭（H.）で吸着した場合には 0.46 単位に過ぎなかつた。なおこの単位は別に詳報する予定の網状赤血球反応により求めた。他方，メチレンブラウを 50% 吸着するに要する活性炭量の逆数，即ち吸着能は（T.）が 2.0，（H.）が 1.33 であつた。

性貧血有効區はいずれも赤血球数の最低日を遷延する作用を示し，酢酸鉛沈澱部，酸性白土吸着部はいずれも遷延作用を示していない。之等の佐々木氏等の結果及び著者等の結果から判断すると，大岡氏の「Erdös 法は抗貧血成分の検定には実用的価値なし」との結論は妥当と認められない。

III 総　　括

1) Phenylhydrazine 貧血による造血効力試験法について吟味し，次の事実を明かにした。a) 連日採血は赤血球数の変動に僅かしか影響を及ぼさない。b) 白鼠の体重 1 kg 当り phenylhydrazine HCl を 30 mg 腹腔内に注射すれば，貧血の経過が明瞭に現われる。

2) この変改法によつて市販肝臓製剤の造血効力を判定した結果，常に赤血球数最低日の遷延が見られ，また遷延の程度は効力の大小に比例するのを認めた。

3) 既往の文献を詳細に検討した結果並に本研究の結果から，Erdös 法は大岡氏の主張するように「抗悪性貧血成分の検定法として実用的価値なし」とは断定できないと結論した。

本研究の一部は文部省科学研究費によつて遂行した。また供した Nagravon は九州大学医学部楠教授より供與されたものであり，Liver liquid parenteral は福岡の 118th General Hospital より寄贈されたものである。茲に記して深謝の意を表する。

文　　献

1. Minot, G. R., and Murphy, W. P.: J. Amer. Med. Assoc., **87**, 470 (1926).
2. Castle, W. B., and Strauss, M. B.: Amer. Med. Sci., **182**, 741 (1931).
3. Stockstat, E. L. R.: J. Biol. Chem., **139**, 475 (1941).
4. Mitchell, H. K., Snell, E. E., and Williams, R. J.: J. Amer. Chem. Soc., **63**, 2284 (1941).
5. Rickes, E. L., Brink, N. G., Koniuszy, F. R., Wood, T. R., and Folkers, K.: Science, **107**, 396 (1943).
6. Smith, E. L.: Nature, **161**, 638 (1948).
7. 佐々木林治郎，中村和夫，鬼原新之丞：糧食研究，No. 205, 1 (昭. 18).
   佐々木林治郎，中村和夫，鬼原新之丞：同　前，No. 216, 10 (昭. 19)
8. Whipple, G. H., and Robscheit-Robbins, F. S.: Amer. J. Physiol., **79**, 271 (1926-7).
9. Castle, W. B., Cohn, E. J., and Minot, G. R.: J. Amer. Med. Assoc., **93**, 1144 (1929).
10. Rominger, E., and Bomskov, Ch.: Z. exp. Med., **89**, 818 (1933).
11. Whipple, G. H.: J. Biol. Chem., **81**, 251 (1929).
12. Singer, K.: Erg. inn. Med. u. Kindh., **47**, 421 (1634).
13. 美甘　義夫：治療及び処方，**16**, 1212 (昭. 16).
    美甘　義夫：日本消化器病学会雑誌，**34**, 653 (昭. 10).
14. Rusznyak, S., and Engel, R. v.: Deutsche Med. Wschr., **58**, 1592 (1932).
15. Erdös, J.: Biochem. Z., **277**, 342 (1935).
16. 大岡増二郎，筒井清，中本惇：日本微生化学会誌，**9**, 403 (昭. 12).
    大岡増二郎：同　前，**14**, 177 (昭. 17).
17. Jastrowitz und Neidhardt: Z. exp. Med., **75**, 526 (1931).
18. Friedländer, E. und Steinitz, E.: Deutsche Med. Wschr., **59**, 135 (1933) A.
19. Strisower, R.: Wien. Med. Wschr., **78**, 1371 (1928).
20. Adlersberg, D., und Gottsegen, G.: Arch. exp. Path. Pharm., **142**, 323 (1929).
21. Heath, C. W.: Fol. Haemat., **51**, 391 (1934).
22. Paschkis, K., und Taylor, G.: Kl. Wschr., **13**, 1538 (1934) II.
23. 大橋政人，橋本明：日本内科学会雑誌，**26**, 502 (昭. 13).

肝臟の造血成分に關する研究 (第2報)
數種水産動物肝臟の造血効力の測定*

米 康夫・富山哲夫
(九州大学農学部水產化学教室)

Studies on Antianaemic Ingredients of the Liver
II. The Estimation of Antianaemic Potency in Livers of Several Marine Animals.

Yasuo YONE and Tetsuo TOMIYAMA

The minimun daily dose of the liver which after the administration over consecutive three days was effective in prolonging the time-period for the minimum red cell count, was found about 0.5 gr fresh bovine liver per kg body weight (Table I).

By using the above minimum daily dose of a sample liver-extract, accordingly, an approximate estimation has been made on the antianaemic potency in livers of several marine animals. Nearly no difference in the potency has been found between the liver-extracts of whale, yellow tail, shark and bovine (Table I and II). It has been observed in both whale and yellow tail that the subcutaneous administration of an extract of mixture of liver and stomach showed a greater potency than that of the liver-extract only (Table III). A comparison of the results contained in Table IV with those in Table II and III reveals that the oral administration of liver-extract showed a little higher potency than the subcutaneous administration.

I 緒 言

牛[1], 馬[2], 鷄[3] 等の肝臟には造血成分の存在が確認されているが, 水產動物肝臟中に於けるその存在は, 研究者によつて一致を欠いている。例えば Whipple, Robscheit-Robbins 両氏[3] は, 魚類肝臟は瀉血貧血の恢復に対し効果がないと報告している。また Hansen, Stub, Forbech 三氏[4] の研究によると, 魚類肝臟は経口投与に当つてムカツキや嘔吐を催すために, 投与が困難であるだけでなく, 悪性貧血に対し微弱な治癒効力しかもつていない。Connery 氏[5] もまた6例の悪性貧血患者に魚類肝臟エキスを用いているが, やはり弱い効力を認めたに過ぎない。

他方, これに反し, Davidson 氏[6] は悪性貧血の患者に対し, 凍結脫脂したタラ肝臟を一日に 250 g 投与したところ, 患者が嫌忌して継続できなかつたが, 生肝臟の 500 g に相当するエキスを 9 例の患者に毎日与えた結果, 24～48 時間後に網状赤血球数の増加を認め, また数日後には赤血球数及び血色素量の 2～3 倍の増加がみられ, 哺乳動物肝臟による治療効果と全く同様であつたと報告している。また佐々木氏等[2] は白鼠に phenylhydrazine (以下 ph-hydz. と略記する) を注射すると同時に, スケソウタラ肝臟粉末を体重 1 kg につき 7 g 与えて, 貧血の抑制試驗を行つたところ, この肝臟粉末には対照の馬肝臟と同様な有効物質が含まれるのを確認している。かように魚類肝臟の造血効力についての既往の研究結果は區々であるので, 著者等は魚類肝臟抽出液の効力と牛肝臟抽出液のそれとの比較を企てた。

* 1947 年 6 月農芸化学会西日本支部例会 (福岡) に於て発表した。
昭和 25 年 7 月 24 日受理

肝臓の造血効力判定法については、著者等は Erdös の ph-hydz. 貧血法を種々検討した結果，この方法にかなりの信頼度があることを明かにし，既に第1報[1]に報告した。しかし本法を造血効力の比較に適用する場合に，もし多量の肝臓を投与すれば，動物の種類による効力の差異を明示できない可能性が予察される。依て先ず牛の肝臓を用いて最小有効量を決定した。次にこの最小有効量だけ各種肝臓を投与した場合の効力の比較をなし，更に肝臓に対する胃の影響，皮下投与と経口投与との比較について研究したので，以下第2報として報告する。

II 実 験 の 部

A. 牛肝臓抽出液の最少有効注射量

佐々木氏等[2]は肝臓中の造血成分を水、稀アルカリ液，或は 70% エタノールにて抽出試験を行つている。しかし水或は稀アルカリ抽出液はいずれも濾過が困難であり，またエタノール抽出では変性凝固した塊の内部の抽出が困難であつたから，著者等は次のような方法で試験用の抽出液をつくつた。即ち擂砕した牛肝臓粥に 80% の水と塩酸とを加えて微酸性とし，約 50° に加温し数時間放置後濾過し，一定量の濾液をとつて中和し，次にエタノールを加えて 70% として濾過し，再び一定量の濾液を減圧濃縮し 1cc が生肝臓 1g に相当する液をつくり，之を適当に稀釈して試験に供した。

試験方法としては第1報の結果を考慮して，次のような方法を用いた。即ち白鼠の腹腔内に体重 1kg につき ph-hydz. HCl の 30 mg を注射し，試験區には毎日三日間に亘り体重 1 kg につき生肝臓の 1.0, 0.50, 0.25 g に相当する肝臓抽出液をそれぞれ白鼠の背部皮下に注射した。なお抽出液の投与を

Table I *The effect of varying amounts of bovine liver extract*[1] *upon the change in red blood cell count (million per cmm)*

Albino rat {Sex	♂	♀	♀	♂	♀	♂	♀				♂	♂
{Body wt.	74	67	62	241	72	335	139	132	125	97	200	279
Amt. of fresh liver (g) injected per kg body wt.	0	0.25	0.25	0.25	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	1.0	1.0
Before injection	9.91	8.55	9.93	9.00	9.30	10.1	10.1	9.02	8.93	9.59	9.50	8.80
Days elapsed after injection 1	9.80	7.20	9.36	8.00	8.37	9.30	7.06	7.08	6.95	7.00	8.93	8.78
2	8.18	6.30	7.85	7.10	8.18	8.79	6.89	5.85	6.32	6.74	7.30	7.85
3	7.23	5.21	5.80	--	7.35	7.86	5.27	4.84	5.82	6.55	6.68	7.50
4	8.20	5.34	6.80	5.95	5.15	5.87	4.93	4.89	6.14	5.52	5.73	6.04
5		6.34	7.32	7.69	6.68	7.12	4.66	4.02	5.24	5.39	4.68	5.68
6		8.04		7.55	8.30	6.58	5.04	4.33	7.00	6.53	6.40	6.09
7				8.51			5.93	5.58	6.89	6.78	6.79	7.09
8							6.83	6.71	7.36	6.28		
Day at minimum r. b. c. count	3.0	3.1	3.0	3.6	4.3	4.4	5.1	5.0	5.0	4.8	5.1	5.4

1) The liver-extract has been obtained by the following procedure: To a minced fresh liver add an appropriate amount of water and adjust pH at about 4.5 with hydrochloric acid. Warm up the mixture to 50° while stirring, leave it stand at about 50° for several hours and then filtered. Pour the filtrate into a necessary amount of alcohol to bring the mixture to 70 per cent in alcohol-concentration. Remove the insoluble part, and concentrate in vacuo. The concentrated extract thus obtained was used for the test after a proper dilution.

2) Injected subcutaneously in the form of extract.

三日間継続したのは注射の誤差を少くするためである。Ph-pydz. 投与後，尾部靜脈より毎日採血して，赤血球数を算定し，最低値の前後 2～3 日の血球数値を図示して，図より最低に達する日数を求めた。その結果は Table I に示す通りである。即ち赤血球数が最低に達するまでの経過日数は対照區が 3.0 日であつたのに対し，0.25 g 注射區は 3.2 日，0.5 g 注射區は 4.8 日，1.0 g 注射區は 5.3 日であつた。從て本検定法により肝臓の造血効力を検定するには，白鼠体重 1 kgに対し生肝臓 0.5 g に相当する量を三日間与える条件を採用した。

B. ナガス鯨，ブリ，及びアブラザメ肝臓抽出液の効果

供試肝臓の抽出液の調製は A 項に示した牛肝臓の場合と同様である。配合飼料** で飼育した白鼠に体重 1 kg 当り ph-hydz. HCl の 30 mg を腹腔内に注射し，その後三日間体重 1 kg 当り無脂肪肝臓 0.5 g 相当量の供試肝臓抽出液を皮下注射し，毎日赤血球数を算定して，その最低に達する日数が，対照區より遷延したものを有効とみなした。実驗の結果は Table II に示す通りである。赤血球数が最

Table II *The effect of subcutaneous administration of liver-extracts of several marine animals upon the change in red blood cell count (million per cmm)*

Kinds of the animals	Whale				Yellow tail		Shark				Control			
Body wt. of albino rat	142	75	213	167	234	83	278	305	258	304	164	113	278	143
Before injection	8.68	10.1	8.63	7.13	10.7	8.66	8.94	7.80	9.01	8.50	9.38	8.68	9.30	8.97
Days elapsed after injection 1	6.73	7.84	6.43	5.17	7.82	7.68	6.58	7.19	6.80	7.00	6.00	5.42	6.74	7.57
2	6.61	6.18	6.22	4.99	7.90	6.99	5.58	6.19	6.21	6.16	5.85	4.99	4.80	6.26
3	6.37	5.97	5.27	4.15	6.19	6.08	5.54	5.43	4.10	4.62	5.24	3.95	4.56	5.85
4	5.62	5.30	5.07	4.07	5.80	5.73	4.99	4.57	4.84	6.30	6.36	4.91	4.78	6.19
5	4.89	4.95	4.70	3.23	5.24	5.61	4.72	4.36	5.34	6.66	6.88	5.69	4.88	—
6	5.85	5.22	5.24	3.34	5.96	5.78	5.57	5.24						6.80
7		5.30	6.03	—			5.76							
8				4.26										
Day at minimum r. b. c.	5.0	5.0	5.0	5.3	5.0	5.3	5.0	5.0	3.0*	3.0*	2.9	3.0	2.9	2.9

* A liver-extract corresponding to 0.25 g fresh liver level was administered.

低に達する日数は，対照區が 2.9 日であつたのに対し，ナガス鯨區が 5.1 日，ブリ區が 5.2 日，アブラザメ區が 5.0 日であつて殆ど差異がない。また Table I に示した牛肝臓の効果と比較すると，僅かに優つている。從て牛肝臓と同様な有効成分が殆ど同量これらの水産動物肝臓中に含まれているものと断定できる。

一般に肝臓中のビタミン A，D，B_2 及びニコチン酸等の含量は動物の種類によつて著るしく相違している。しかし肝臓の造血成分については陸産，水産を問わずまた魚種によつても殆ど差がみられないということは，肝臓の造血成分の作用がどんな種類の動物の生体内に於ても，同程度の重要性をもつているためであろうとも推定され，生化学的に興味深いものがある。

C. ナガス鯨肝臓・胃混合物及びブリ肝臓・胃混合物の抽出液の効果

**飼料としては次の二種類を用いた。 a) トウモロコシ 40，澱粉 20，米 10，蚕蛹 10，米糠 17，混合無機塩 3。 b) ペプトン 9.1，小麦粉 83.5，バター 4.0，植物油 2.0，乳酸石灰 0.6，食塩 0.8，肝油 1,000 I.U.

Table III *The effect of subcutaneous injection of extract of mixture of liver and stomach upon the change in red blood cell count (million per cmm).*

Kinds of marine animal	Whale			Yellow tail		Control	
Body wt. of albino rat	164	149	145	141	172	164	204
Before injection	11.20	9.75	7.68	8.55	7.46	9.38	11.14
Days elapsed after injection 1	8.30	8.91	6.66	5.92	6.58	6.00	7.17
2	7.48	8.04	6.67	5.83	5.83	5.85	6.03
3	5.30	6.60	5.28	5.48	5.71	5.24	5.12
4	4.27	4.66	4.04	4.55	4.98	6.36	5.64
5	3.05	3.79	3.64	4.42	4.81	6.88	5.74
6	3.53	3.59	4.04	5.10	3.48		
7	3.83	4.21	4.06	6.22	5.60		
8	4.89	4.81	4.85	7.09	6.09		
Day at minimum r. b. c. count	5.1	5.5	5.0	5.1	5.7	3.0	3.0

肝臓擂砕物4に対して胃擂砕物1の割合に混合し，A項に記載した方法で抽出液を調製した。実験方法はB項に記載したものと全く同様である。抽出液の皮下注射量は無脂肪肝臓と胃との混合総量の0.5gに相当する量である。その結果は Table III に明かなように，赤血球数の最低に達する日数は対照區が3.0日であつたのに対し，クジラ區は5.2日，ブリ區は5.4日であつて，肝臓のみの実験(Table II)に比べ僅に造血効果が増強しているようである。

Table IV *The effect of oral administration of whale liver extract and liver-stomach extract upon the change in red blood cell count (million per cmm).*

Kinds of extract	Whale				Whale liver-stomach			Yellow tail liver	
Body wt. of albino rat	117	151	137	101	169	147	145	66	263
Before injection	8.53	8.31	9.92	9.92	8.66	9.85	9.04	8.20	10.28
Days elapsed after injection 1	7.39	8.86	6.68	7.81	8.19	9.05	7.82	7.34	8.02
2	7.02	8.19	6.56	7.41	6.71	7.66	6.34	6.84	—
3	4.71	4.96	6.45	6.68	6.10	4.84	6.22	5.64	6.64
4	4.56	5.18	6.30	6.48	5.08	4.45	4.73	4.96	6.06
5	4.06	4.98	4.97	6.36	4.24	3.43	4.23	4.83	5.36
6	4.85	6.01	6.19	6.17	3.58	3.78	3.91	4.80	5.33
7	5.09	5.78		6.79	3.88	4.36	4.22		
8	6.10	6.81			4.59	4.95	4.74		
Day at minimum r. b. c. count	5.4	5.3	5.2	5.8	6.2	5.5	6.1	5.8	5.8

D. ナガス鯨肝臓抽出液並に肝臓・胃混合物抽出粉末を経口投与した場合の効果

体重 1 kg 当り ph-hydz. HCl の 30 mg を腹腔内に注射した白鼠の一群には，体重 1 kg 当り生肝臓 0.5 g に相当するクジラ肝臓抽出液を注射器で直接口腔内に三日間投与し，他の一群には肝臓・胃混合物抽出液の噴霧乾燥*** した粉末を体重 1 kg 当り与肝臓と胃との合量 0.5 g 相当量だけ三日間少量の飼料と混じて完全に食下させた。この両群につき毎日赤血球数を算定した結果は Table IV に示した。即ち赤血球数の最低に達する日数は，ナガス鯨肝臓抽出液の経口投与區では 5.5 日，肝臓・胃混合物抽出粉末の経口投与區では 5.9 日であつた。他方，前者を同時に皮下注射した場合には平均 5.1 日 (Table II)，後者の水溶液を皮下注射した場合には 5.2 日 (Table III) であつた。之等の比較から明かに経口投与の場合の方が，造血効果は強く現われることがわかる。恐らくは白鼠の胃に於て，肝臓抽出液中の外在因子が変化をうけて，全体としての効果が増強されたものと推定される。また経口投与の場合にも，肝臓・胃混合物の方が肝臓のみの場合よりも多少効果が大であつた。

III 総　　括

Phenylhydrazine 貧血に対する牛肝臓の最小有効量を求め，次にこの最小量の肝臓を三日間 Phenylhydrazine 貧血の白鼠に投与する方法によつて，数種水産動物肝臓の造血効力を比較検討し，次のような結果を得た。

1) 牛肝臓抽出液の造血効力判定に必要な最少注射量は，三日間皮下注射する条件では，白鼠の体重 1 kg 当り生肝臓 0.5 g 相当量である。

2) ナガス鯨，ブリ及びアブラザメの肝臓は，無脂肪肝臓当りみな殆ど近似した造血効力をもつている。

3) ナガス鯨，ブリ及びアブラザメ肝臓の造血効力は，牛肝臓のそれに劣らない。

4) ブリ或は鯨の肝臓・胃混合物の造血効力は，それらの肝臓のみの効力より多少大である。

5) 肝臓の抽出液を経口投与した場合の造血効力は，皮下注射した場合よりも多少大である。

本研究の一部は文部省科学研究費によつて遂行した。また鯨肝臓は大洋漁業株式会社，サメ肝臓は日本水産株式会社より提供されたものである。茲に記して深謝の意を表する。

文　　献

1. Minot, G. R., and Murphy, W. P. : J. Amer. Med. Assoc., **87**, 470 (1926).
2. 佐々木林治郎，中村和夫，鬼原新之丞：糧食研究，No. 205, 1 (昭. 18).
   佐々木林治郎，中村和夫，鬼原新之丞：同　前，No. 216, 10(昭. 19).
3. Whipple, G. H,, and Robscheit-Robbins, F. S. : Amer. J. Physiol., **79**, (271 1926-7).
4. Hansen, O., Stub, O., and Forbech, V. : Acta. Med. Scand., **76**, 26 (1931).
5. Connery, J. E. : Amer. J. Med. Sci., **180**, 603 (1930).
6. Davidson, L. S. P. : Brit. Med. J., **2**, 347 (1932).

*** 噴霧乾燥条件は送風溫度 130°C，排風溫度 70°C，気圧差水柱 10 mm であつた。

肝臓の造血成分に関する研究　(第 3 報)
原子爆弾症に對する効果*

桝屋富一・富山哲夫・米　康夫
(九州大学医学部第三内科・九州大学農学部水産化学教室)

Studies on Antianaemic Ingredients of the Liver
Ⅲ. The Effectiveness of the Liver Extract upon the Atomic Bomb-disease

Tomiichi MASUYA, Tetsuo TOMIYAMA and Yasuo YONE

The present paper deals with the effect of a bovine liver extract upon the recovery in blood-pictures of several serious cases and in blood and bone marrow-picture of one typically serious case. The liver extract used has been prepared by a following procedure; extract an autolyzed liver with water, add ethanol to make its concentration 70 per cent, concentrate the alcoholic solution in vacuo, and dilute a syrup obtained so as to make 1 cc of the resultant solution to correspond to five grams fresh liver.

The comparison between serious cases administered with the liver extract and those without added it has been made of the changes in hemoglobin concentration, red blood cell count and white blood cell count which were observed during stay in the hospital until 30 Sept., 1945 (55 days elapsed after the bombardment). It will be seen from Table 3 that the liver extract was as much effective as the blood-transfusion in increasing the rate of increase in W.B.C. It is also of interest that a simultaneous treatment with both the liver extract and the blood-transfusion gave rise to an outstanding effect in increasing W.B.C.

The examination of blood-and bone marrow-picture of one serious case revealed that the intra-muscular administration of the liver extract was effective in curing a critical stage of a serious type in contrast to some other critical cases which did not receive the liver extract. The change in bone marrow during the treatment with the liver extract is as follows. Nearly complete destruction of bone marrow tissue was observed on 32nd day after the bombardment; the recovery of R.B.C. system as well as W.B.C. system was under way on 53rd day (20cc of the liver extract having been administered); mother cells of R.B.C., W.B.C. and blood platelets, and their mature forms were found on 76th day when 40 cc of the liver extract had been administered.

From the above results of the clinical examinations it can be postulated that the liver extract most probably influcence directly on the regeneration or reactivation of bone marrow tissue. Furthermore, the work recently reported by Carter et al. of the effect of vitamin B_{12} upon leukopenia produced by irradiation of X-ray, seems to suggest that the active principle

昭和 25 年 10 月 10 日受理

* 本研究の概要は 1947 年 11 月 8 日栄養食糧学会九州支部例会(福岡市)にて講演報告した。

effective to the regeneration of W.B.C. in the atomic bomb-disease will not be vitamin B_{12}.

(From Laboratory of Internal Medicine and of Fishery Chemistry of the Kyushu University)

I 緒　　言

肝臓の造血成分の生理作用に関しては，従来主として悪性貧血に対する効果についての研究が多い。著者等は1943年以来肝臓の造血成分の抽出分離に関する研究を展開しているが，1945年の秋に所謂原子爆弾症の治療に対して肝抽出液を投与する機会に遭遇した。当時，九州大学医学部第三内科では現地調査の結果，原子爆弾症の本質は汎骨髄癆であることを確認したので，肝抽出液投与による治療効果に期待がかけられた依て著者等が吟味調製した牛肝濃厚抽出液を重症例に投与してみたところ，比較的多量投与例には所期の効果が認められた。

最近，白鼠にレントゲン線を照射して発生する貧血特に白血球減少症には，ビタミンB_{12}を毎日筋肉内投与しても全く無効であることが報告されているので[1]，原子爆弾症に対する肝抽出液の治療効果は恐らくB_{12}以外の抗貧血因子によるものと推察される。この点に関しては動物試験により更に吟味を進めている。

なお本研究は既に1945年末に完了していたが，発表が留保されていたので，報告が遅延したことを附記する。

II 実験結果及び考察

A. 原子爆弾症多数例の血液像からみた効果

本報に述べる原子爆弾症とは，被爆 2～4 週後に多発し，しかも死亡率の高かつた一群の内科的疾患であつて，この場合に主としてみられた症状は，1) 高熱，2) 脱毛，3) 壊死性歯肉咽頭炎，4) 出血傾向（歯肉出血，皮膚点状出血）及び血小板の減少，5) 白血球殊に好中球の減少の5症状であつた。

その病像の本態をなすものはウラニウム 235 或はプルトニウム 239 の核分裂に伴う強い放射能の直接或は間接作用によつて起つた骨髄造血機能の高度障碍であつて，汎骨髄癆乃至無顆粒細胞症であることを著者の一人（桝屋）は既に1945年9月6日福岡医学会に於て報告した。もとより生殖器，肝，腎その他の臓器組織にも若干の病変を検出しえたが，脱毛を除いた上記の主症状と直接関係のある病変は，骨髄以外には見出されなかつた。従て治療の原則は血液の補給，白血球機能の補償並に骨髄の庇護とその機能恢復にあるべきである。

当時の原爆重症患者は放置すれば死亡し，しかも人類が初めて経験した疾病であつて，治療法はもとよりその本態さえ，著者等の研究迄は全く知られていなかつた。従て効果が期待できて，当時入手し得た方法は悉く用いた。即ち著者等の肝臓抽出液[2]（1 cc は 5 g 生肝臓より抽出したもの），輸血，肝臓粉末剤 Hepatose，酵母末 Ebios，ビタミン C 剤 Hiscobal を投与し，散発的には白血球機能廃絶にもとづく感染の治療にペニシリンを用いた。依て一剤のみの治療成果を判定するには，極めて困難な症例が多かつた。

しかし他の治療法に関係なく，たゞ著者等の牛肝抽出液のみについてみると，Table 1 に示したように之を全く投与しなかつた重症患者7例中には1例の死亡例を出したに対し，之を投与した重症患者 14 例中には1例を出したに過ぎない。しかも後者は原爆症状からは全く恢復したが，被爆 84 日目（入院後 55 日目）に膿胸を起して死亡している。従てこの両群に於ける死亡率の差異は或程度肝抽出液の効果に帰すことができよう。

---

1) Carter, R.E., Busch, E. and Strang, V.: Blood. 5, 753 (1950).

2) 肝臓の造血成分に関する研究　第2報（本誌に印刷中）

Table 1 The mortality in patients of atomic bomb-disease as influenced by the administration of the liver extract.

	Amt. of liver extract administered		With no liver extract	Total
	>10 cc	<6 cc		
Critical case	8	6	7	21
Died	1*	0	1	2
Light case	1	0	11	12
Died	0	0	0	0

* Nearly completely recovered from the atomic bomb-disease, but died from pyothorax, on 84th day after the bombardment.

Table 2 Average change in blood picture of 38 patients with the progress of time after being bombarded.

Time-interval of examination	Weeks elapsed after being bombarded	Hb %	R.B.C. million	W.B.C.
30 Aug.—9 Sept.	4	51	3.21	2,700
6 Sept.—12 Sept.	5	66	3.13	2,680
13 Sept.—19 Sept.	6	64	3.17	3,340
20 Sept.—26 Sept.	7	62	2.96	4,490
27 Sept.—3 Oct.	8	67	2.97	5,570
4 Oct.—10 Oct.	9	68	3.20	7,180
11 Oct.—17 Oct.	10	77	3.26	9,550

Table 3 The effect of the liver extract on critical patients having white blood cell count less than 3,000.

Date of Examination	Average of 4 patients adm. with liver extract, Hepatose, and yeast.			Average of 5 patients adm. with Hepatose and yeast.			Average of 4 patients adm. with Hepatose, yeast, and blood-transfusion.			Average of 4 patients adm. with liver extract, Hepatose, yeast, and blood-transfusion		
	W.B.C.	Hb	R.B.C.	W.B.C.	Hb	R.B.C.	W.B.C.	Hb	R.B.C.	W.B.C.	Hb	R.B.C.
		%	million		%	million		%	million		%	million
Estimated on 9~15 Sept.*	1,900	72	3.26	1,650	63	2.48	2,120	58	2.89	2,090	71	3.19
Estimated after elapse of 12~23 days after the above estimations**	5,140	67	2.52	3,660	65	2.54	5,650	41	2.43	7,000	62	2.51
% Increase or decrease	+170	−7	−23	+122	+3	+ 1	+166	−29	−15	+235	−13	−21

* Shortly after entering the hospital. ** 14~17 days and 18~23 days for the liver extract-group and its control-group, respectively; 12 ~ 20 days and 15 ~ 20 days for the transfusion-group and the liver extract-transfusion-group, respectively.

次に肝抽出液の効果を患者の血液所見の変異から窺知しようと試みた。しかし血液像は患者の被爆後の経過日数及び症状の程度によつて著るしく変動するので，之等の因子について略々同様な例を選んで比較すべきである。先づ本症患者 38 名の血液所見の時間的推移をみると，Table 2 に示すように赤血球数は被爆第 7～8 週を最低として以後徐々に増加し，白血球数は第 4 週以前は不明であるが，検査した限りでは第 4～5 週を最低として以後比較的急速に増加している。従て入院日数の永い肝抽出液投与群と短い非投与群とを比較することには，批判の余地がある。しかし 9 月30日迄の検血成績は概ね揃つているので，この期日に限定すれば両群の比較は可能である。他方，投与群には重症例が多く，非投与群には軽症例が多いので，症例は少くなるが，重症例即ち白血球数 3,000 以下のものに限つて比較することが妥当である。

斯様に二つの条件を満足する症例について，肝抽出液投与群，肝末投与群，輸血群，三者併用群に分けて対比してみると，Table 3 に示すような結果となる。即ち白血球数の増加率では肝末投与群の 122 % に対し，肝抽出液投与群及び輸血群はそれぞれ 170 %，166 % と増加し，三者併用群は 235 % と著明な効果が認められ，処置前には殆ど同数であつた白血球数が処置後には約 1,500～3,400 の差を生じている。他方赤血球の増加率をみると反対に投与群の方が少い。しかし末梢血中の赤血球数の変化によつては，次のような理由で治療剤の効果の判定は困難である。第一に赤血球の寿命は永く，造血が高度に阻害されてから残存赤血球数の死滅する迄の期間が 30～60 日もあるので，病初骨髄の赤血球造成が極度に阻害された場合にでも，末梢血中の赤血球数はあまり減少しないし，また骨髄の赤血球造成が旺盛となつた頃にも貧血の程度は殆ど変らないから，赤血球数の少数の変化は造血機能活動の標示として意味が少い。また第二に赤血球数には出血や栄養摂取の多少が大きく関係しているので，赤血球数には出血や栄養摂取の多少が大きく関係しているので，赤血球数の少数変動によつて簡単に論議することはできない。

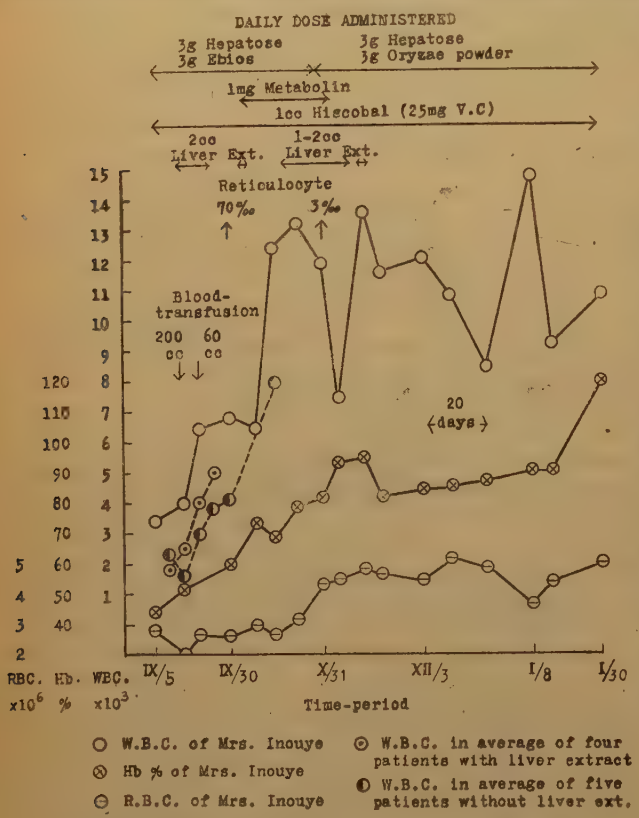


Fig. 1 Change in blood picture of a critical case of a serious type of the atomic bomb-disease (I. Inouye, Female, aged 46, bombarded at Hiroshima).

要するに，以上吟味した之等諸群には肝末及び酵母末をみな同様に投与しているので，以上の白血球増加率の差は明かに肝抽出液投与の効果によるものと考えられる。

B. 重症患者一例の血液像及び骨髄像からみた効果

重症患者の内で，牛肝抽出液を比較的多量に与えた一例については，血液像，骨髄像等を詳細に吟味したので，肝抽出液の効果が判然とみられた。

この臨床例は当時 46 才の婦人（井上）であつて，1945 年 8 月 6 日広島で被爆し，8 月 24 日から脱

毛，歯肉腫張，出血，胸部四肢に米粒大の点状出血が現われ，悪寒戦慄を伴う高熱を発した。入院当時は，赤血球 278 万，白血球 3,400* であり，特に白血球の内で好中球は正常者が一般に 4,000 以上であるのに，本例では 816 に過ぎなかつた。9 月 5 日入院して以後の治療としては，全期間を通じて毎日 Hepatose 3g 及び Hiscobal 1 cc（ビタミン C 25 mg）を投与し，入院後 54 日目迄は毎日 Ebios 3 g，それ以後はその代りに毎日 Oryzae 末（麹菌製剤）3 g を与え，また入院後 30 日目より 59 日目迄は毎日 Metabolin 1cc（B_1 1 mg）を与えた。牛肝抽出液は入院後 7 日目より 19 日目迄毎日 2 cc，29 日目と 30 日目とにそれぞれ 2 cc，43 日目より 66 日目迄は毎日 1～2 cc（計 24 cc），69 日目より 71 日目迄は毎日 1 cc を筋肉注射し，合計 57 cc に達した。更に入院後 8 日目に 200 cc，15 日目に 60 cc の輸血を行つた。Fig 1 には治療中に於ける赤血球，白血球及び血色素量の変化並に対照として肝抽出液投与及び非投与の重症例の白血球数の変化をも示した。

Fig 1 に明かなように，第 1 回の肝抽出液投与期間に白血球は急激に増加し，肝抽出液非投与の重症患者 5 名の平均増加曲線に比較して早く増加し始めている。しかも注射開始後 18 日目（被爆後 55 日目）に測定した網状赤血球数は 70 % に達し，造血機能の恢復が想像される。この推定はこの時の骨髄像（Fig. 3）の所見からも裏付けできる。更に入院後 43 日目より第 3 回の肝抽出液投与を連日実施するに及んで赤血球数及び Hb % は急速に増加し，被爆後 86 日目には赤血球数 400 万以上に達している。また第 3 回の肝抽出液投与の期間（被爆後 86 日目）中に測定した網状赤血球数は 3 % であつて，造血機能の正常化を意味している。但しこの時期には白血球数は一万以上に増加しているが，これはこの病症の治癒期にすべて

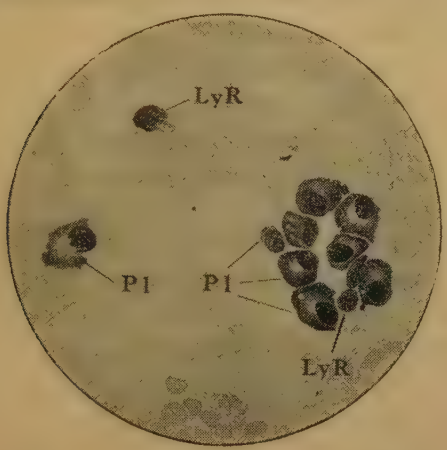


Fig. 2 Showing bone-marrow smear at a critical stage (32-day period after the bombardment) of a serious type of the atomic bomb-disease.
PI : Plasmocytic reticulum cell according to rohr.
LyR : Lymphoid reticulum cell according to rohr.
Name of the patient : The same as given in Fig. 1.

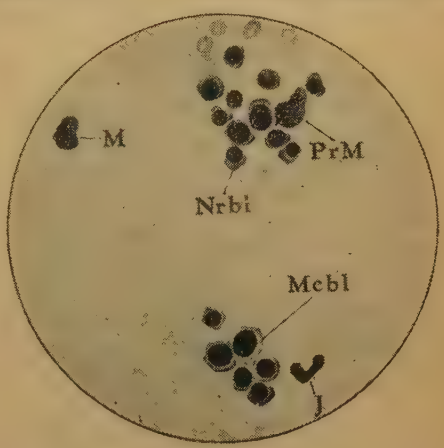


Fig. 3 Showing bone-marrow smear at a recovering stage (53-day period after the bombardment) of a serious type of the atomic bomb-disease.
Mcbl : Macroblast.
NrBl : Normoblast.
PrM : Promyelocyte.
M : Myelocyte.
J : Metamyelocyte.
Name of the patient : The same as given in Fig. 1.

* 原爆症の 5 症状が全部著明であることや，骨髄像からみても，白血球は 3,000 以下と推定されるので，この白血球数には多少の疑問がある。

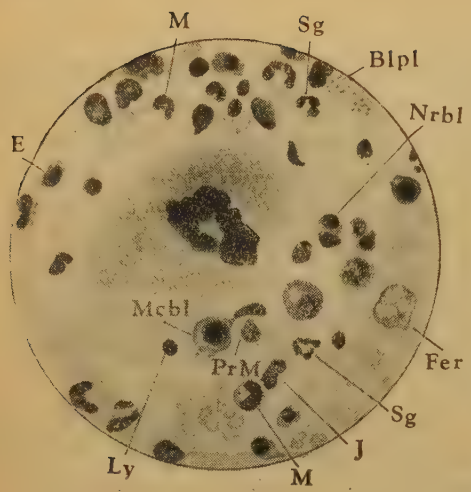


Fig. 4 Showing bone-marrow smear at a recovered stage (76-day period after the bombardment) from a serious type of the Atomic Bomb-disease.
Mgk : Megakaryocyte.
Blpl : Blood platelets.
Fer : Socalled Ferrata cell.
E : Eosinophilic myelocyte.
Prm, M, and J : Promyelocyte, Myelocyte, and Metamyelocyte, respectively.
Sg : Segmentocyte.
Ly : Lymphocyte.
Nrbl : Normoblast.
Name of the Patient : The same as given in Fig. 1.

みられた現象である。

本患者の恢復の模様は，以上のような血液像からだけでなく，次に示す骨髄像をみると明かであつて，これによつて肝抽出液の本質的効果は骨髄の正常化にあつたものと理解できる。Fig. 2, 3 及び 4 はそれぞれ極期，恢復期及び治癒期の骨髄像を示す。

Fig. 2 は被爆 32 日目の治癒前の胸骨々髄像であつて，この一視野には血球母細胞が全く見られずして，たゞ異常に増殖した形質細胞のみが見える。特徴としては赤血球母細胞は激減し，白血球母細胞も著るしく少く且つその成熟は全く停止し，血小板母細胞は全く見られなかつた。即ち汎骨髄癆の最重症型の骨髄に一致している。

Fig. 3 は肝抽出液 20 cc を投与後，即ち被爆後 53日目の所見であつて，赤血球造成及び白血球系の復活しつゝあるのがみられる。しかしそれらの成熟はあまり充分ではない。この時期には形質細胞の異常増殖はみられない。

Fig. 4 は肝抽出液 40 cc 投与後，即ち被爆後 76 日目の所見であつて，造血細胞は稍々過形成の像を呈し，赤血球，白血球，血小板の母細胞及びその成熟形態が見られる。なお本患者は原爆症状から全治し，退院している。

前記の Hepatose 単用の重症例と Hepatose・肝抽出液併用の重症例との比較の結果，並に重症例一例について肝抽出液投与後の恢復模様を血液像及び骨髄像によつて追跡した結果に基いて考察すると，被爆患者の肝臓には余り異常が認められていないから，肝抽出液は恐らく直接に骨髄組織の恢復に役だつたものと考えざるを得ない。

総　　括

原子爆弾症患者に牛肝抽出液を筋肉注射した場合の効果を，血液像及び骨髄像の恢復をたどつて吟味し，次の結果をえた。

1. 同一処置期間中に於ける患者の血色素，赤血球及び白血球数の変化を肝抽出液投与群と非投与群とについて比較すると，投与群は白血球の恢復率が著明に良好であつた。この比較は，Hepatose 投与或は輸血. Hepatose 投与の対照群との比較であるから，この著明な差異は主として肝抽出液の効果によるものと考えられる。

2. 肝抽出液を多量投与した重症患者一例の骨髄像の変化をみると，被爆後 32 日目には汎骨髄癆の最重症型を示し，53 日目即ち肝抽出液 20 cc 投与後には赤血球数及び白血球系の復活進行中を示し，76 日目即ち肝抽出液 40 cc 投与後には赤血球，白血球，血小板の母細胞及び成熟形態が見られ，恢癒状況を示した。

3. 之等の検討の結果，肝抽出液は恐らく直接に骨髄組織の恢復に役立つたものと考えられる。またCarter 氏等の研究からみると，この有効成分はビタミン B_{12} ではないと推察される。

本研究を遂行するに当つては，九州大学医学部沢田教授の懇篤な御指導を忝うし，また同学部第三内科医局員は熱心な協力を惜しまれなかつた。更に矢吹農学士は肝抽出液の製造に助力された。之等の各位に厚く謝意を表する次第である。また本研究の成果につき批判と助言とを与えられた広島市原爆影響研究所（ABCC）の PAUL CARSON 博士及び文献の御教示を賜つた同所の柳沢文正博士に深謝する。なお本研究の一部は科学研究費を以て支弁したことを附記する。

肝臓の造血成分に関する研究 第4報
肝臓の高空耐性増強効果について *

富山哲夫・矢吹耀男・米 康夫
(九州大学農学部水産化学教室)

Studies on the Antianemic Ingredient of Liver—IV:
On a Liver Component Effective to Fortify the Tolerant Capacity for the High Altitude

Tetuo Tomiyama, Teruo Yabuki and Yasuo Yone

The studies presented in this report have been conducted to relate the antianemic action of liver to the tolerant capacity for the high altitude since an anemic symptom of a considerable severity has been frequently observed in albino rats which were repeatedly exposed to a low pressure.

The apparatus shown in Fig. 1 has been used for keeping the experimental animals at a constant pressure for a fairly long period, 200 cc. of air per min. being constantly supplied.

It has been observed that adult mice fed a diet with a solubilized liver for a week, survived twice as long as their respective controls upon daily exposing to air pressure of 205mm. of mercury (Fig. 2). It has further been found that when growing albino rats which had been placed for about four days on a synthetic diet containing the solubilized liver were exposed daily to air pressure of 300mm. of mercury, showed only a slight change in red blood cell count as compared with their respective controls (Fig. 3). These data suggest that the antianemic ingredient in the solubilized liver has something to do with increasing the tolerant capacity for the high altitude.

I. 緒 言

昭和 19 年2月に組織された文部省緊急科学研究第 82 班の活動として，著者の一人（富山）が航空糧食に関する研究を展開している時に，低圧負荷実験中の観察から抗貧血物質が高空耐性増強効果を示すだろうとの示唆をえたのが，本研究の端緒である。

高空耐性物質としては，戦時中の第7陸軍航空技術研究所の報告[1]によると，葉緑素，鉄，ビタミン P，グルタチオン等が挙げられている。著者等は白鼠を用いて葉緑素の効果を追試中に，低圧負荷を繰り返すと白鼠の耳朶が蒼白となることを観察した。依て低圧負荷を毎日繰り返した場合の赤血球数の変化を測定したところ，低圧死に至るものは常に極度の貧血を起すか，或は極度に赤血球数の増加を示すことを確認した。従て低圧負荷の繰り返しによつて起ると考えられる造血機能の消耗を防ぐことができれば，高空耐性を増強できるだろうと推察された。

それ故に造血成分に富む肝抽出物をマウス及びラッテに経口投与して高空耐性増強効果を実験した結果，

1951 年9月 15 日受理 九州大学農学部水産学教室業績

マウスの低圧致死試験によると投与区は対照区に比し約2倍の低圧負荷時間に耐えることがわかり，またラッテの低圧負荷期間に於ける赤血球を計数したところ，投与区は常に対照区に比しその変動が小であることが明かとなつた。依て肝抽出物の示す高空耐性増強作用の機構についても，既往の文献に照して考察を進めた。本報告はこれらの研究結果及び考察について記載したものである。

Ⅱ. 実　験　方　法

低圧負荷による致死の時間を測定するには成長したマウスを用い，魚粉 22，小麦澱粉 60，脂肪 10（肝油 1% を含む），マツカラム塩 3，酵母 5 より成る完全合成飼料にて飼育したものを 15 分間に 9,000m.（230 mm Hg）相当の気圧迄低下させ，更にその気圧に 20～30 分間保つて高空耐性の弱いものを除去した。かように選別したマウスの 4～5 尾を一試験区に用い，対照区及び試験区を同時に低圧負荷試験に供した。低圧負荷の方法としては，岩垂氏[2]は 10 分間に 10,000m. に相当の低圧として負荷実験を行つている。しかし本研究に於ては毎分 1,500m の高度に昇る速さを基準とし，6 分間に 9,000 m 相当の低圧となるように規則正しく減圧させた後，試験動物の挙動を観察しつゝ一日 2～7 時間の負荷を数日間繰り返し，その間の致死時間を測定した。なお実験中は一分間に 200cc の空気を補給した。また一箇の低圧槽内に試験区及び対照区の動物を共に収容し，外気温の影響を同一にするために二箇の低圧槽を同時に運転した。

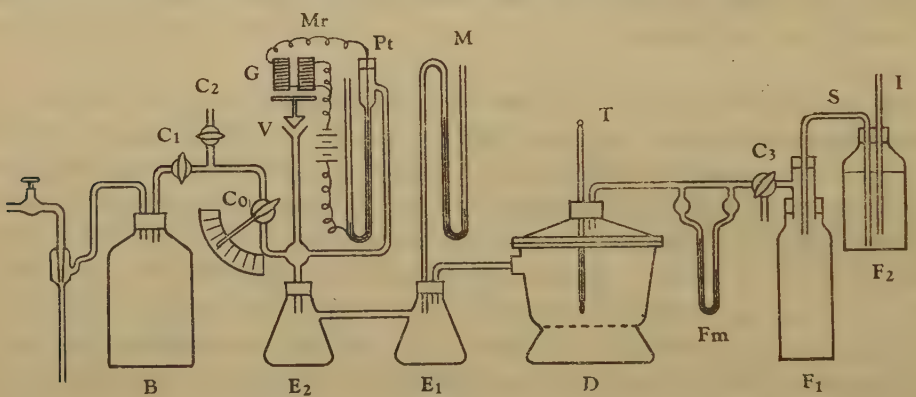


Fig. 1 Showing the apparatus devised to keep low pressure constant for a fairly long period.

低圧負荷装置には Fig. 1 に示す装置を用いた。先ず C_1 を閉じて水流ポンプを仂かした後，試験動物を低圧槽 D 内の金網上に載せ，C_2，C_0 を閉じ，次に C_3 を流測計 Fm と外界と通じるように開き，更に C_1 を開く。次に M の水銀柱が所要の速度で変化するように C_0 を徐々に開き且調節する。所定の気圧のところに調節器の白金線 Pt を固定してあるので，この圧力に達すると，電気回路が閉じてマグネットが動作し弁 V を開き，外界の空気が水流ポンプに流れて気圧の下降を防ぐ。逆に気圧が上昇すれば水銀面が Pt から離れるので，V は閉じて再び気圧は下降する。かような自動調節によつて長時間に亘つて ±1mmHg 程度の変動で低圧を負荷することができる。常圧に戻す場合には C_1 と C_0 を閉じ，C_2 を開き，次に徐々に C_0 を開いて低圧負荷速度と同一速度で昇圧するように調節する。D に供給する空気量は Fm で測定するが，その補正は次のように行えば簡単である。C_3 によつて Fm と F_1 と連絡し，F_2 より水が流下し始めた時に計時し，適当量流下した時に再び計時して，同時に C_3 を切り換えれば，その時の Fm の読みに相当する空気の流量を F_1 に流下した水量から知ることができる。

他方，赤血球数の変動をみる実験にはラッテを用い，前記の合成飼料にて飼育して正常成長を示すもののみを選んだ。試験区のラッテは合成飼料に供試試料を混合したもので数日間予備飼育した後，低圧負荷試験

に着手した。試験動物の赤血球数は試験前に少くとも二回尾部の静脈血をとり，Thoma-Zeiss Haematitometer を用いて測定し，変動の少いことを確かめた。試験中に於ける赤血球の計数は採血による貧血を避けるために，2～4 日おきに実施し，測定日は概ね負荷を休止するようにした。負荷時間は毎日 2 時間より始め 6 時間迄延長し，低圧は 7,000m 相当の圧に維持した。

実験に用いた肝抽出物は，ブリの肝臓に適量の湯を加え，稀塩酸を加えて pH 4～5 とし，約 50°C に数時間放置した後に濾過し，濾液を中和後，減圧濃縮したものである。

Ⅲ. 実　験　結　果

A. 低圧致死時間に及ぼす肝抽出物の効果

実験方法の項で示したような方法でマウスを選択し，試験区には乾燥飼料の 3% に相当する肝抽出物（新鮮肝として約 30%）を投与し，一週間予備飼育の後，試験に供した。先ず予備試験として 12～16g のマウスに毎日 2.5～7 時間 9,000m 相当の低圧を負荷した場合の生存率を求めてみた。その結果は Table 1 にみられるように，対照区は全滅しているのに対し肝投与区及び肝-葉緑素投与区はそれぞれ平均 55% 及び 70% の生存率を示した。

Table 1 The effect of the solubilized liver and chlorophyll on percentage survival of mice after successive daily exposure to low pressure of 205mm. of mercury at 19-24°C.

Kinds of supplement	1st experiment		2nd experiment	
	Percent survival	Survival period of died mouse in hour	Percent Survival	Survival period of died mouse in hour
None	0	5,6,10,18,18	0	9,14,21,21
Solubilized liver	60	11,18	50	9,21
Chlorophyll	40	12,12,18	0	7,8,14,21
Solubil. liver plus chlorophyll	40	6,12,18	100	

次に一日一尾当り 0.2g の肝抽出物（新鮮肝として約 2g に当る）を与えて一週間予備飼育した 15～20g のマウスに 9,000m の低圧を負荷し，毎日負荷時間を逓増して致死時間を記録した。二回の実験結果は Fig. 2 に示す通りであつて，肝抽出物投与区は対照区より約二倍永く生存している。しかも本実験では負荷時間を毎日逓増しているが，もし一定時間を毎日負荷すれば，対照区との差は更に大きかつたに違いない。とも角以上の結果からみると，肝抽出物中には強力な高空耐性増強物質の存在することが明らかである。

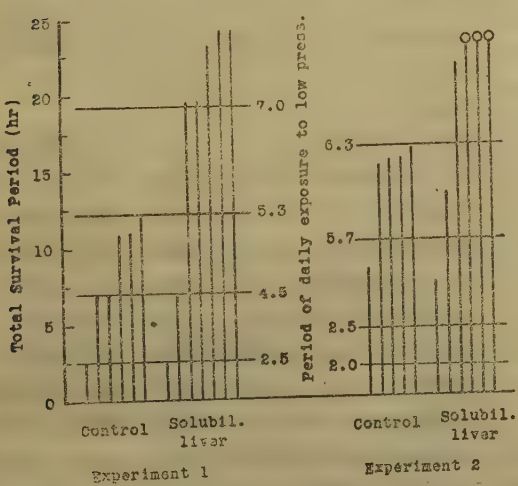


Fig. 2 Total survival period of adult mice after a daily exposure to low pressure.

B. 低圧負荷中の赤血球数の変動に及ぼす肝抽出物の効果

前項の実験によつて肝が高空耐性を増強することを知つたが，その機構を知る目的で，低圧負荷を繰り返しつゝある間に尾部静脈血の赤血球数に如何なる変化が起るかにつき吟味を試みた。

前記の合成飼料に 3% の肝抽出液（新鮮肝として約 30%）を混じたもので 4 日間予備飼育した 60～80g のラッテと，合成飼料のみで飼育した殆ど同体重の

ラッテとを 10 月 18 日より 11 月 19 日迄 7,000m 相当の低圧を負荷した。この実験期間中の低圧槽内の温度範囲は 17～22°C，負荷中の温度上昇は最大 3°C であつた。また緑葉素の効果をも比較する意味で，

Table 2 The change in red blood cell count (million per cmm.) of albino rats which were repeatedly exposed to air pressure of 300 mm. mercury and which received a synthetic diet with or without supplement of the solubilized liver.

Date on count	Supplement / Length of exposing to low press.	No supplement		Solubil. liver		Chloropyll+ solubil. liver		Chlorophyll	
		male	female	male	female	male	female	male	female
18/X	Prior to the expt.	7.84	8.74	7.94	9.84	7.92	9.74	8.60	8.44
24/X	After 3 days of 2-hr. exposure daily	8.98	9.70	8.10	9.08	8.56	9.12	8.38	10.5
28/X	After 3 days of 2-hr. exposure daily	7.39	9.56	6.89	8.05	7.26	10.2	8.99	11.5
31/X	After 2 days of 4-hr. exposure daily	8.02	12.2	7.94	8.87	8.16	...	10.9	7.18
4/XI	After 3 days of 4-hr. exposure daily	9.68	14.0	8.40	9.04	8.26	7.80	8.10	10.2
8/XI	After 3 days of 6-hr. exposure daily	10.2	13.2	8.60	9.13	8.18	8.20	8.20	8.16
10/XI	After 1 day of 6-hr. exposure daily	8.48	*	7.90	8.04	8.42	9.04	8.49	7.24
16/XI	After 5 days of 6-hr. exposure daily	6.80		7.86	7.60	8.61	8.33	8.70	6.20
19/XI	Time of death after exposure to 205mm. Hg	2 hours 10min.		alive 3 hours after 35min. 4hrs.					

* died on the 20th day after start of the experiment.

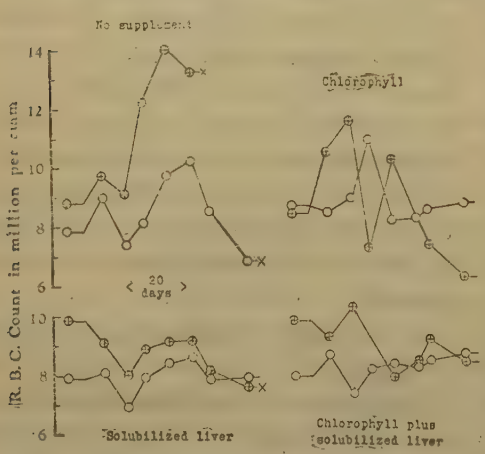


Fig. 3 Fluctuation in red blood cell count of venal blood of albino rats, fed a diet with or without supplement of solubilized liver, which was subjected to a daily exposure to low pressure. ×, died; ○, survived.

乾燥大根葉 3g のエーテル抽出物を油にとかして 100g の合成飼料に加えた葉緑素投与区並に肝−葉緑素投与区をも同様に試験に供した。その結果は Table 2 並に Fig. 3 に示す通りである。

Fig. 3 から明かにみられるように，肝抽出液を投与すると低圧負荷中の赤血球数の変動は対照区に比して明かに小さく，380～460 万であつた。対照区では多くの場合に低圧負荷を始めてから数日中は赤血球数が増加し，更に負荷が続けられると急速に低下し，次に再び増加と低下とを繰り返し，しかもこの総変動は 710～900万であつた。また葉緑素を与えても赤血球数の変動は依然として大きく，630～1420 万であつて対照区と大差ないので，葉緑素は高空耐性の増強には無効である。しかし之に肝抽出物を与えると，初めて血球数の変動が 340～560 万と低下した。たゞ葉緑素はヘモグロビンの合成に当りその構成成分を提供する意味で役立つだろうと考えられるので，肝抽出物と共用すれ

ば一層高空耐性を高める可能性があろう。この可能性は前項の致死試験の結果からみても多少裏づけされているようである。

Ⅳ. 考　　察

動物に低圧を負荷した場合，短時間の内に血液の単位容積当りの血球数が増加することは多数の研究者により確認せられ，一般には組織の酸素不足に対応する為に補償的に血球数を増加させる現象と説明されている。その機構については Firley 氏[3] は血液が濃縮する結果であるとし，Schneider 氏等[4] は恐らく運動時に血球が急激に増加するのと同一原因であろうと推察しているのに対し，Barcroft 氏[5] は脾臓に貯蔵された赤血球を脾臓の収縮によつて急激に血流に放出するためと説明している。なお Schubert 氏[6] は脾臓の外に肝及び門脈系が血球の貯蔵場所の役目をなしていると追加している。この Barcroft 氏の説には多数の支持者がある。

低圧負荷の時に補給される赤血球は貧血に対する抵抗性は弱く，従つて一時的に増加した赤血球は更に低圧を負荷すると減少し，逆に網状赤血球は増加する[7]　これは低圧負荷中に自然に血球の新生を刺戟しつゝある証査であつて，血液に bilirubin が生じて造血の刺戟をなすこと[8]，低圧負荷動物の血液中に hemopoietin が存在すること[9]，また赤血球中に血球新生促進物質が存在すること[10] からも理解される。しかし之等は恐らく刺戟的作用をなすもので，骨髄に於ける血球新生の正常化に寄与するかは疑問である。従つて更に低圧を続けると本研究で認めたと同様に貧血を起すことが報告されている[11]。次に低圧負荷動物の組織の変化をみると，長時間低圧負荷したモルモットや家兎の場合には，脾臓には変化はみられないが，骨髄内には活潑な細胞分裂が起り，肝は nekrobiotische Degeneration を起して脂肝を呈することも注目されている。

さて斯様な既往の文献に照して，高空耐性増強の判定をどの現象によつて判定すべきかは自ら明らかである。戦時中陸軍に於ては低圧負荷中に短時間に起る赤血球の増加率の大小によつて耐性の強弱を判定した[1]。しかしこれは前記のように補償的に脾臓の収縮によつて起る現象であつて，低圧負荷の繰り返しに対する耐性ではない。むしろ高空耐性の強弱は，長時間の低圧負荷或は負荷の繰り返しによる肝の変性，骨髄の過重による貧血の程度或は低圧負荷による致死時間によつて判定されねばならない。

本研究にみられたように，肝抽出物投与により赤血球数の著るしい変動は防止され，また低圧負荷死迄の時間が著るしく延長して高空耐性を増強したのは，恐らく肝抽出物中の B_{12}，葉酸等が肝細胞中のメチール転移を助けて抗脂肝的作用を示し，また骨髄中の Proliferation を円滑にし，抵抗性の弱い血球の消耗を補填したことに原因したものであろう。斯様に考えると，この低圧負荷増強成分は恐らく抗貧血物質と同一であろうと推察されるが，その決定は将来の研究に俟たねばならない。

Ⅴ. 総　　括

1.　成長したマウスに水銀柱 205mm の低圧を繰り返し負荷して致死時間を求めることによつて，ブリ肝抽出物の高空耐性効果を吟味した結果，一尾当り 0.2g 肝抽出物（約 2g の生肝に相当）を毎日投与した区は対照区に比し致死時間が約2倍延長した。

2.　60～80g のラッテに水銀柱 300mm の低圧を 2～6 時間殆ど毎日負荷した場合には，710～900 万に及ぶ著るしい赤血球数の総変動が観察された。他方，ブリ肝抽出物を飼料の 3%（生肝として 30%）添加すると，赤血球数の変動は 380～460 万に低下した。

3.　本研究の結果は高空耐性増強物質が造血機能と密接な関係をもつことを示唆する。依て文献に照して肝抽出物の作用機構について考察を行つた。

終りに本研究は藤野義彦，中尾しづえ及び志賀たかの諸氏の助力を仰いで遂行したもので，こゝに深謝を

捧げる次第である。また本研究は文部省科学研究費によつて支弁したものであることを附記する。

文　　献

1) 第7陸軍航空技術研究所：“糧食を以てする航空人的戰力增強の研究”（昭和 18）.

2) 岩垂　荘二：日農化., **20**, 434 (昭和 19).

3) Birley : “Repts. Air Medical Investigation Committee”, London, No. 2 (1918).

4) Schneider, E. C., Lutz, B. R. and Gregg, H. W. : *Amer. J. Physiol.* **50**, 216 (1919-20).

5) Barcroft : *Erg. Physiol.*, **25**, 78 (1926).

6) Schubert, G. : *Pflugers Archiv*, **235**, 256 (1934).

7) Kaulbersz, J. und Wischnowitzer, E. : *Z. exper. Med.*, **89**, 238 (1933).

8) Varzar, F., von Arvey, A., Peter, J. und Schölderer, H. : *Biochem. Z.*, **257**, 111 (1933); Giannini, G : *Z. exper. Med.*, **64**, 431 (1929).

9) Förster, J. : *Biochem. Z.*, **145**, 309 (1924).

10) 太　　田：北越医., **58**, 194 (1942).

11) Tyler D. B. and Baldwin, F. M. : *Proc. Exp. Biol. Med.*, **31**, 823 (1934).

12) von Zolka, E. : *Z. exper. Med.*, **76**, 120 (1931).

肝臓の造血成分に関する研究 第5報
肝臓の高空耐性増強成分と造血成分との関係*

富山哲夫・矢吹耀男・米 康夫
(九州大学農学部水産化学教室)

Studies on the Antianemic Ingredient of Liver—V.
A Similarity between the Antianetic Ingredient and a Liver Component Effective to Fortify the Tolerant Capacity for High Altitude

Tetuo TOMIYAMA, Teruo YABUKI and Yasuo YONE

Estimations have been made of the tolerant capacity for high altitude of various purified fractions of cattle liver by taking the following items as a criterion of effectiveness, namely, total fluctuation in red blood cell count, and survival period during repeated exposure to low pressure.

It has been found that the active ingredient can be adsorbed by the active carbon from slightly acidic medium, but not by the acid clay (Fig. 1 and 2); that it can be precipitated by phosphotungstic acid, but not by basic lead acetate (Figs. 3, 4 and 7); and that it is soluble in 70 per cent ethanol, but seems to be insoluble in 90 per cent ethanol (Figs. 5 and 6).

The results of this study lead to the conclusion that the active ingredient under study may be most likely similar to one of the antianetic ingredients contained in liver.

Ⅰ. 緒 言

著者等は第4報[1]に於て，肝抽出物を経口投与したマウスは無投与区に比して約2倍の低圧負荷時間に耐えることを明かにし，また肝抽出物を経口投与した白鼠は毎日低圧を繰り返し負荷されても尾部静脈血の赤血球数に於て僅少の変動しか示さないことを確かめた。之等の結果から高空耐性附与の機作について論考し，肝の高空耐性増強物質は血球造成と密接な関連をもつものと推察した。

本研究ではこの推察を更に確かめる目的で，肝の高空耐性増強物質の分別精製を試みた結果，有効物質は肝の造血成分と同一或は類似物質と考えられるに至つたので，ここにその結果を報告する。

Ⅱ. 実 験 方 法

赤血球数の変動をみる実験にはラッテを用い，魚粉 22，菜種油 10 (肝油 1% を含む)，小麦澱粉 60，マツカラム塩 3，酵母5より成る合成飼料で飼育し，正常成長を示すもののみを選んだ。試験区の動物は，前記の合成飼料に供試試料を混合したもので数日間予備飼育した後，低圧負荷試験に供した。低圧負荷には気圧自動調節式低圧負荷装置[1]を用い，毎日 2~6 時間 7000 m 相当の低圧に曝した。赤血球数の測定には，Thoma-Zeiss Haematitometer を使用し，血液は尾部の静脈をカミソリ刃で切断することにより溢出した

1951年9月15日受理

* 九州大学農学部水産学教室業績

ものを用いた。試験前少くとも2回計数し変動の少いことを確かめてから低圧負荷を開始した。試験中に於ける赤血球の測定回数は採血による影響を避けるために，2～4 日おきに計数し，この計数日には低圧は負荷しなかつた。

他方，低圧負荷による致死時間の測定には，赤血球変動試験終了後のラッテ或はマウスを用いた。マウスの場合には前記の合成飼料に供試料を混和したもので数日間予備飼育した後，毎日 2～7 時間，9000m. 相当の低圧（230 mm 水銀柱相当圧）を負荷し，その間の致死時間を測定した。なお低圧負荷の速度は5分間に 230mm Hg の気圧となるように調節した。

Ⅲ. 結 果 及 び 考 察

A. 高空耐性増強物質の濃縮

肝の高空耐性増強物質を分離濃縮する方法としては，造血成分との関係を明かにする目的から，造血成分の濃縮に屢々用いられる活性炭処理方法を適用せんとし，先ず有効物質が微酸性で活性炭に吸着されるや否やについて吟味を試みた。

牛肝臓を肉挽器にてよく粥状とし，之に適量の湯を加え，稀塩酸を少量加えて pH 4.5 とし，50～55°C に数時間放置した後に濾過した。濾液を pH 2.5 に調節し，之に 4% の活性炭或は酸性白土を加えて 30 分間振盪した後，濾液と吸着部とに分別し，吸着部は更に n-アンモニヤを含む 50% エタノールで溶出した。かようにして得た活性炭吸着物，酸性白土吸着物及び非吸着物について低圧負荷試験を行つた。即ち 180～250g のラッテ一尾当り新鮮肝 10g に相当する各試料を毎日投与し，低圧負荷期間中の赤血球数を測定し，また成長したマウスには一尾当り新鮮肝 0.2g に相当する各試料を毎日経口的に与えて低圧負荷期間中の生存時間を測定した。

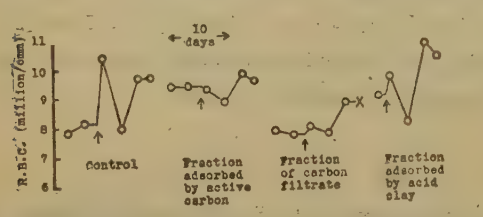


Fig. 1. The effect of a daily exposure to 7000m. altitude on fluctuation in r.b.c. count of venal blood of adult albino rats receiving active carbon-adsorbate, active carbon-filtrate and acidclay-adsorbate.

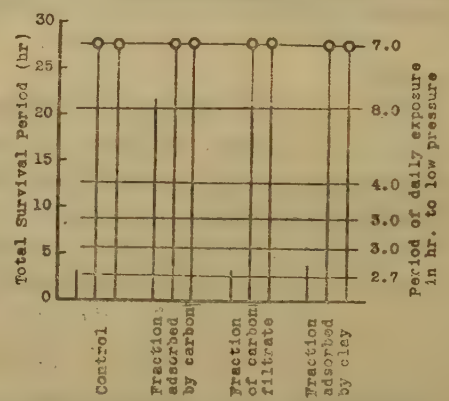


Fig. 2. Survival period after a daily exposure to 9000m. altitude of adult mice receiving three fractions given in Fig. 1. Temperature ranged from 13.5° to 19.5°. Temperature-rise after exposure amounted to 1.5～4.0°.

結果は Fig. 1. 及び Fig. 2. に示すように，試料を投与していない対照区及び酸性白土吸着物投与区は赤血球数の総変動が 500～600 万と大きく，活性炭吸着物投与区はその変動が 150 万で最も小であつた。非吸着物投与区は第四回目の測定前の低圧負荷中に死亡したので，赤血球変動値として不完全ではあるが，その変動は比較的小さいようであつた。マウスの致死時間では，肝の分劃区分の投与量が少かつたことと，実験に供した尾数が少かつたので明瞭を欠くが，活性炭吸着区が他のいずれの区よりも長時間の低圧負荷に耐えたことはうかがわれる。本実験に於て活性炭吸着区が多少有効性を示したのは，造血成分の定量的吟味の研究に於て後報するように，メチレン青の相対的吸着能 100 及び 65 の二種の活性炭を 5% 使用してえた吸着部の造血力価がそれぞれ 1.7 及び 0.75 を示した結果から推察して，ここに使用した活性炭の性能が悪く相対的吸着能 70 のものであつたことに起因するものと思われる。要するに以上の実験から肝の高空耐性

増強物質は造血成分と同様に，微酸性で活性炭に吸着されることが明かとなつた。

B．高空耐性増強成分の精製

造血成分の精製法に依つて本有効成分の精製を試み，精製途中にえられる各区分の効果について実験した。

（1） A項に示した方法によつて牛肝の抽出物と残渣（R）とに分離した後，抽出部（1.35kg 生肝相当）を 750cc の 20% 溶液とし，硫酸で pH 4 とし，活性白土 20g を加え振盪後一夜放置濾過し，濾液に活性炭 40g を加え一時間攪拌後濾過し，濾液（CF）を分別した。活性炭吸着部は n-アンモニヤを含む 50% エタノール 2l で溶出し，溶出液はバリタで pH 9 とし減圧濃縮してアンモニヤを除き，次に硫酸を加えてその濃度を 5% として濾過し，燐タングステン酸の 5% 硫酸液を加えて生ずる沈澱（PPC）と濾液（PFC）とを分別し，両区ともそれぞれバリタを加えて燐タングステン酸を除いた。生物試験には R 区，CF 区，PPC 区及び PFC 区を 80～120g のラッテ一尾当り新鮮肝 5g に相当する量だけ毎日飼料に混合して投与し低圧負荷による赤血球数の変動をみた。この試験が終了してから，更に之等の白鼠を用いて 9000m. の低圧に於ける致死試験を行つた。

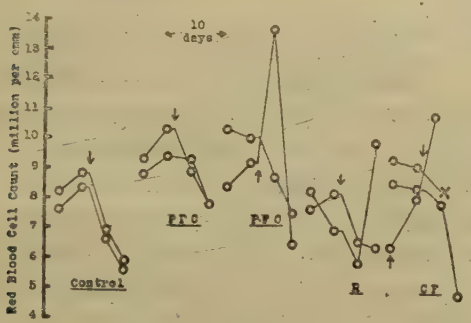


Fig. 3. The effect of a daily exposure to 7,000m. altitude on fluctuation in r.b.c. count of venal blood of growing albino rats receiving liver residue (R), active carbon-filtrate (CF), phosphotungstate fraction (PPC) and phosphotungstate-filtrate fraction (PFC). Temperature of the expt. ranged from 29° to 31°C.

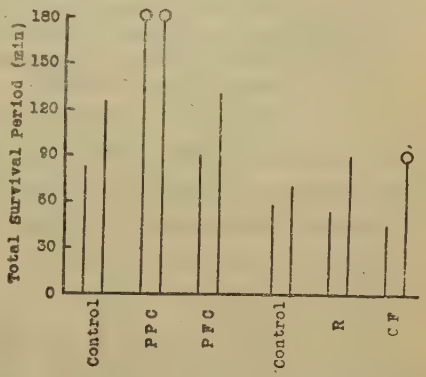


Fig. 4. Survival period in min. on exposure to 9,000m. altitude of the albino rats after ending the experiments given in Fig. 3.

実験結果は Fig. 3. 及び Fig. 4. に示した。対照の無投与区では，白鼠尾部静脈の赤血球の総変動数は 240～320 万，致死時間は 60～70 分であつたのに対し，R 区は変動 180～500 万，致死時間 55～85 分で無効，CF 区は変動 350～440 万，致死時間一尾は 45 分，一尾は 90 分の負荷に耐えている程度で効果は極めて僅少であつた。PFC 区は変動 250～1150 万，致死時間は無投与区が 80～125 分であたのに対し 90～130 分で無効，PPC 区はこれらに反し変動 160～240 万であり，低圧負荷 180 分に達してもなお生存を続けた。かように有効成分は造血成分と同様に[2]，活性炭吸着物中の燐タングステン酸沈澱部に全部集ることが明かとなつた。しかし活性白土には吸着されないので，葉酸及び B_{12} 以外の成分と思われる。

（2） 造血成分との関係を更に明瞭にする目的で，Cohn[3] のアルコール分劃法を加味して次のような精製法を実施してみた。A項に記したと同様にしてえた肝抽出物に無水エタノールを加えて 70% とし，凝固物を除いて後，更にエタノールを添加して 90% として生じた沈澱物を集め，水に溶解し，バリタを加えて pH を 8 に調整してから塩基性醋酸鉛を加え生ずる沈澱を除いた。濾液には硫酸を加えて鉛を除き，更に硫酸濃度を 5% とし，次に燐タングステン酸の 5% 硫酸溶液を加えて生じた沈澱を濾別し，沈澱及び濾液にそれぞれバリタを加えて燐タングステン酸を除き，更に硫酸を加えて過剰のバリウムを除去した。かくして得た各区分，即ち 70% エタノール凝固部（70 EP），90% エタノール可溶部（90 ES），燐タングステン酸

沈澱物（PPA）及び燐タングステン酸濾液（PFA）を 90～120g の白鼠一尾当り新鮮肝 5g に相当する量だけ毎日飼料に混合して投与しつゝ，低圧負荷による赤血球数の変動並びに致死時間を測定した。

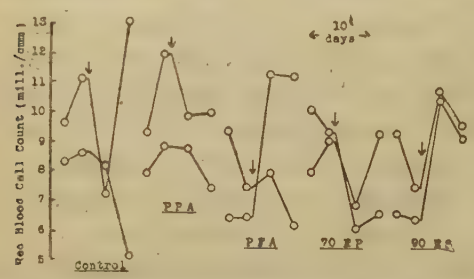


Fig. 5. Effect of a daily exposure to 7,000m. altitude on fluctuations in r.b.c. count of growing albino rats receiving 70% ethanol insoluble (70EP), 90% ethanol soluble (90ES), phosphotungstate precipitate (PPA) and phosphotungstatefiltrate (PFA). Temperature of the expt. ranged from 27° to 29°C.

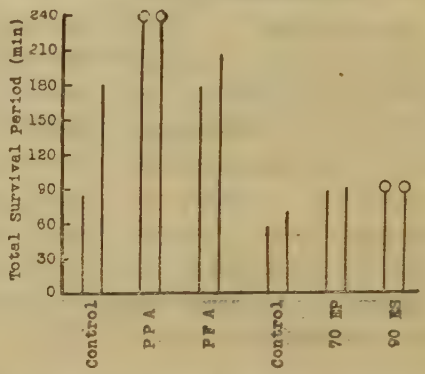


Fig. 6. Survival period in minute on exposure to 9,000m. altitude of the albino rats after ending the experiments given in Fig. 5.

Fig. 5. から明かなように，対照の無添加区，PFA 区，70 EP 区 及び 90 ES 区 では赤血球数の変動はそれぞれ平均 650 万，360 万，420 万及び 520 万と大きかつたが，PPA 区では赤血球数の変動は 180 万と遙かに小さかつた。また Fig. 6. にみられるように，対照区の致死時間が 90～180 分であつたのに対し，PFA 区は 180～200 分であり，PPA 区は 240 分間の負荷後にも生存していた。また対照区の致死時間が 50～70 分の場合に，70EP 区は 90 分，90 ES 区は 90 分でもなお生存していた。この実験の範囲では有効成分が 90% エタノールに可溶であるかは不明である。しかし 90% エタノール不溶部より分離した PPA 区が顕著な効果を示すことから判断すると，有効成分の大部分は 90% エタノールに不溶とみてよいと思う。

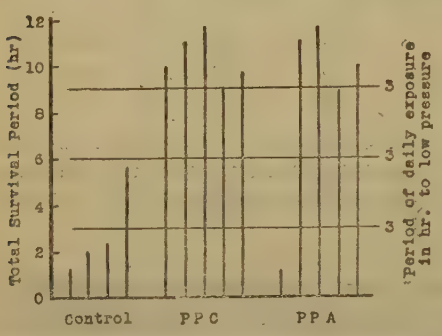


Fig. 7. Survival period of adult mice receiving subcutaneous administration of the phosphotungstate fraction obtained from active carbon-eluate (PPC) and from 90% ethanol insoluble (PPA).

以上の吟味によつて燐タングステン酸沈澱区が最も有効であることを知つたが，更に之を確証する意味からマウスの致死試験を行つた。試料は 12～19g のマウス一尾当り新鮮肝の 1g 相当量を毎日皮下注射しつゝ低圧負荷を繰り返した。Fig. 7. から明かなように，活性炭吸着部を燐タングステン酸で沈澱した PPC 区も，また 90% エタノール不溶部を燐タングステン酸で沈澱した PPA 区も，共に無添加区に比して遙に長時間の低圧負荷に耐えている。これらの実験から有効成分は 90% エタノール難溶，燐タングステン酸沈澱性であるといえる。

Ⅵ. 総　　括

肝臓に含まれる高空耐性増強成分の分別精製を試みた結果，該成分は次に示すように造血成分と類似の性質をもつことが明かとなつた。

1）肝臓中の有効成分は微酸性で活性炭に吸着され，アンモニヤ性アルコールで溶出される。活性白土によつては吸着されないので，葉酸及びビタミン B_{12} と異る有効成分であろう。

2）70% エタノールには可溶であり，90% エタノールには難溶である。

3）塩基性醋酸鉛によつては沈澱されないが，燐タングステン酸によつては沈澱される。

終りに臨み，実験に助力された藤野義彦，中尾しづえ，及び志賀たかの諸氏に深謝の意を表する。なお本研究の一部は文部省科学研究費によつて行つたものである。

文　献

1）富山哲夫，矢吹耀男，米　康夫：日水会誌 **18**, 299 (1953).
2）Cohn, Minot, Alles and Salter : *J. Biol. Chem.*, **77**, 325 (1928).
3）Cohn, Minot, Fulton, Ulrich, Sargent, Weare and Murphy : *J. Biol. Chem*,. **74**, XIX (1927).

肝臓の造血成分に関する研究—Ⅵ.
アオウキクサに對する成長促進効果に就て*

米　康夫・富山哲夫
（九州大学農学部水産化学教室）

Studies on Antianaemic Ingredients of the Liver—VI.
On the Growth-Promoting Effect of Liver Extract and its Putrified Fractions upon *Lemna paucicostata* Hegelm

Yasuo Yone and Tetuo Tomiyama

Tomiyama and Yone[1] have reported that the solubilized fish body and its carbon-adsorbate were effective to promoting the growth of *Lemna paucicostata*. This paper presents the findings that the solubilized liver and its active carbon-adsorbate were also effective to promoting the growth whereas a non-adsorbable fraction was ineffective (Table 2 and Fig. 1). The effectiveness was observed either at level of two mg per litre (Table 3 and 5) or at levels which were calculated based on the yield of each fraction from the solubilized liver (Table 2). Data presented here show that the growth-promoting effect is not due to an increase in amount of nitrogen of the culture media or of organic form.

緒　言

著者等はさきに全魚体の液化物はアオウキクサ *Lemna paucicostata* Hegelm の成長を促進する物質を含有し，しかも該有効物質は活性炭に吸着される有機物であることを知つた。[1] また著者の一人（富山）は魚体液化物が細菌の発育を促進すること，またヂフテリヤ菌の毒素産生にも極めて有効であることを確認した。[2] 他方，近年肝臓中より分離された一群の抗貧血物質，例えばビタミン B_{12} 及び葉酸が乳酸菌類の発育促進の効果を示し，いずれも活性炭に吸着されることから考えると，これらの肝臓中の抗貧血物質も魚体液化物と同様にアオウキクサの成長を促進するだろうと推察される。

かゝる観点から，著者等の方法によつて得た肝抽出物及びこれを活性炭に吸着してえられる吸着物及び非吸着物についてアオウキクサの成長促進効果を試験した結果，肝抽出物及び活性炭吸着物はいずれも効果を示し，特に活性炭吸着物の効果は顕著であるに反し，非吸着物は無効であることを明かにしたので，以下その結果について報告する。

実　験　方　法

実験に供したアオウキクサは改変 New Jersey 水耕液（以下改変 N.J. 液と略記する）に数日間前培養したものゝ内，四枚葉のもののみを用いた。300 cc 容のビーカーに水耕液 250 cc をとり，各種試料を添加し

1952 年 1 月 9 日受理
* 昭和 25 年 10 月，長崎に於ける日本水産学会九州支部大会に於て発表，九州大学農学部水産学教室業績

た後ウキクサを移植して，温室内で 20 日間培養し，葉の増加数（実験後の葉数と開始時の葉数との差）及び実験終了後の乾葉重量を測定して試料の効果を比較した。培養液は 2 日目毎に取換えて細菌の影響のないように注意した。なお実験に供した肝臓抽出物は磨砕した長須鯨肝臓或は牛肝臓に適量の湯を加え，塩酸で微酸性にして約 50°C で数時間放置した後濾過し，濾液を中和後濃縮したものである。活性炭吸着物は前記の微酸性肝臓抽出物に活性炭を混和攪拌して吸着し，水洗後微アルカリ溶液で溶出し，更に吸着溶出を繰り返したものである。なお活性炭吸着の際，吸着されなかつた非吸着物は中和後，濃縮して実験に供した。

実験結果及び考察

1. 肝臓よりの収量を基準とした効果試験

肝抽出物区には 3.3 mg を改変 N.J. 液 1 L. に添加したものを用い，対照区には硫酸アンモニヤ 2 mg を添加して肝抽出物区と全窒素量を同一とした。また活性炭吸着物区には肝抽出物 3.3 mg より得られた活性炭吸着物 0.6 mg を，また非吸着物区には肝抽出物 3.3 mg より得られた量の約 1.5 倍の非吸着物 3.1 mg を添加した。之等にアオウキクサの四枚葉を浮べ，21～44°C の温室内で培養試験した。なお各試料の組成は Table 1 に示す通りである。実験の結果は Table 2 及び Fig. 1 に示すように，肝抽出物は葉の増加数に於ては対照と殆ど差がなかつたが，乾葉重量は遙かに大であつたので，成長促進効果があつたと見做され

Table 1 The analytical data of the samples.

		Liver extract	Adsorbed fraction	Non-adsorbed fraction
Dry matter	(%)	78.5	50.1	66.4
Total N of wet matter	(%)	9.5	3.9	3.8

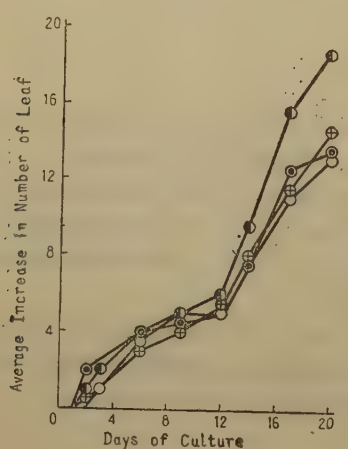


Fig. 1 Rate of growth of the plant with supplement of whale liver extract, adsorbed, and non-adsorbed fraction.
The control, ○; liver extract at 0.28% level of total N, ⊕; adsorbed fraction at 0.03% level of total N, ◐; non-adsorbed fraction at 0.12% level of total N, ◉.

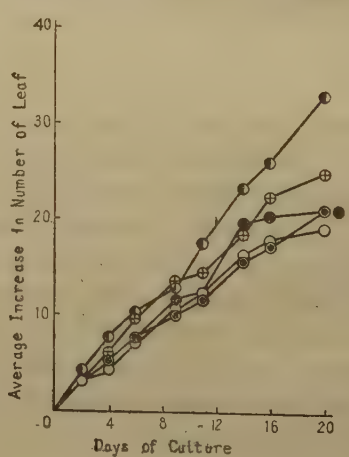


Fig. 2 Rate of growth of the plant with supplement of whale- and bovine-liver extract, adsorbed, and non-adsorbed fraction.
The control, ○; 2 mg./L. whale liver extract, ●; 2 mg./L. adsorbed fraction, ◐; 4 mg./L. non-adsorbed fraction, ◉; 2 mg./L. bovine liver extract, ⊕.

Table 2 The effectiveness of liver extract, adsorbed fraction and non-adsorbed fraction added at level based on yield of each fraction. (Date on experiment: Sept. 20～Oct. 10, 1950)

	Control $(NH_4)_2SO_4$	Liver extract	Adsorbed fraction	Non-adsorbed fraction
mg. Dry matter added per L.	2.0	3.3	0.6	3.1
Added N as per cent of T-N	0.28	0.28	0.03	0.12
Increase in number of leaf	12 14	12 17	17 20	14 13
mg. Dry leaf at end of exp.	2.9 3.1	3.4 4.9	3.6 3.4	3.3 2.8

る。また活性炭吸着物の添加量は他の区に比し 1/3～1/5 にすぎなかつたが，最も顕著な成長を示した。これに反し非吸着物は収量よりの計算量の 1.5 倍量を添加したのに拘らず対照と殆んど差が認められなかつた。以上の試験から，肝抽出物はアウオキクサの成長促進物質を含有し，該物質は活性炭に吸着されることが確かめられた。

2. 試料の乾物を基準とした効果試験

1) 項の実験に於て活性炭吸着物の添加量は他の区に比して乾燥物として 1/5 にすぎなかつたが，顕著な効果を示した。本実験に於ては各試料を乾燥物を基準として同率に添加し，その効果を互に比較してみた。

Table 3 The effectiveness of whale- and bovine-liver extract, adsorbed fraction and non-adsorbed fraction added at a same level. (Date on experiment: Sept. 30～Oct. 20, 1950)

	Control $(NH_4)_2SO_4$	Liver extract of Whale	Liver extract of Bovine	Adsorbed fraction	Non-adsorbed fraction
mg. Dry matter added per L. media	2	2	2	2	4
Added amt. of N as per cent of T-N of the media	0.28	0.16	0.17	0.10	0.15
Increase in number of leaf	24 23	23 27	31 27	42 32	24 26
mg. Dry leaf at end of exp.	5.5 5.4	6.7 7.0	7.0 6.6	7.9 7.3	5.4 6.2

Fig. 3 Showing the relative effectiveness of the various samples.
B: A bovine liver extract. E: A whale liver extract.
A: Fraction adsorbed by an active carbon.
N: Non-adsorbed fraction. C: Control.

即ち硫酸アンモニヤ，長須鯨肝抽出物，牛肝抽出物及び活性炭吸着物をそれぞれ水耕液 1 L に対し乾燥物として 2 mg ずつ添加し，なお非吸着物区には成長促進効果があるや否やを明確にするために倍量の 4 mg の非吸着物を添加して，18～44°C の温室内で 20 日間培養試験した。なお実験に供した各試料は 1) 項の実験に使用したものと同じである。実験の結果は Table 3, Fig. 2 及び Fig. 3 に示すように，活性炭吸着物の效果は最も顕著であり，牛肝抽出物がそれについで效果があつた。長須鯨肝抽出物は Fig. 2 及び Table 3 に明らかなように，葉の増加速度及び 20 日後の乾葉重量は対照及び非吸着物区のそれらより大であるから，效果があつたと見做される。それに反し非吸着物区は他の試料の倍量を添加したにも拘らず対照と殆んど差が認められなかつた。

上記の実験に於ては各試料は乾燥物量として同率に添加したため，対照区の窒素量は試験区のそれよりも多量添加したことになつた。依て更に同様試験を繰り返し，対照区には試験区の中で最も窒素添加量の多い肝抽出物区の窒素に等しくなるように硫酸アンモニヤを添加して比較してみた。即ち試験区には鯨肝抽出物，活性炭吸着物及び非吸着物を水耕液 1 L に対しそれぞれ乾燥物として 2 mg ずつ添加し，対照区には肝抽出物区に添加した窒素と同量の窒素を含む硫酸アンモニヤ 1.2 mg を添加して 21～38°C の温室内で 20 日間培養試験した。なお各試料の組成は Table 4 に示す通りである。実験の結果は Table 5 及び Fig. 4 に示すように活性炭吸着物が最大の成長促進效果を示し，肝抽出物も近似の效果を示した。また非吸着物区は対照に比して殆ど差が認められなかつた。但し本実験の後半は曇天が続いたため前実験の結果ほどの顕著な差は認められなかつた。

以上 1) 及び 2) 項の実験に於て添加した活性炭吸着物の窒素量は，対照区及び肝抽出物区に比して 1/1.4～1/10 にすぎなかつたが，最も顕著な效果を示した。依てこの效果は添加した窒素によるものでもなく，また有機態窒素によるものでもないといえる。しかも抽出物の大部分の窒素化合物を保有する筈の非吸着物区が対照と殆んど差を示さなかつたことからも裏書される。

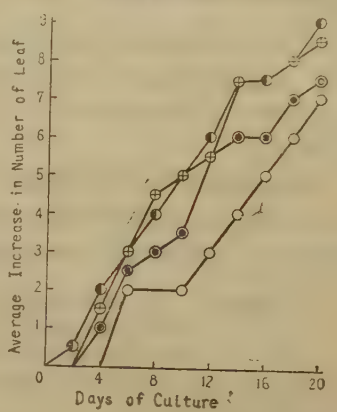


Fig. 4 Rate of growth of the plant with supplement of whale liver extract, adsrbed, and non-adsorbed fraction.

The control, ○; 2mg./L. liver extract, ⊕; 2 mg/L. adsorbed fraction, ◐; 2 mg./L. non-adsorbed fraction, ◉.

Table 4 The analytical data of the samples.

	Liver extract	Adsorbed fraction	Non-adsorbed fraction
Dry matter of the sample (%)	74.9	71.2	49.8
Total N of the sample (%)	9.8	6.3	2.9

摘　　要

1) 牛及び鯨の肝抽出物，それらの活性炭吸着物及び非吸着物を改変 New Jersey 水耕液に加え，アオウキクサの成長に対する效果を試験した。

2) 供試試料の収量を基準とし，或は試料の乾物を基準として試験しても，肝抽出物にはアオウキクサの成長促進物質が含まれることを確認した。

Table 5 The effectiveness of liver extract, adsorbed fraction and non-adsorbed fraction added at the same level. (Date on experiment: Oct. 28～Nov. 17, 1950)

	Control $(NH_4)_2SO_4$	Liver extract		Adsorbed fraction		Non-adsorbed fraction	
mg. Dry matter added per L.	1.2	2.0		2.0		2.0	
Added amt. of N as per cent of T-N	0.17	0.17		0.12		0.08	
Increase in number of leaf	7	8	9	10	8	6	9
mg. Dry leaf at end of exp.	2.2	2.9	3.1	3.2	2.9	2.1	2.2

3) 肝抽出物を微酸性で活性炭処理してえられる非吸着物は全く無效であつたが，吸着物は顯著な效果を示した。

4) 肝抽出物を水耕液に加えた時の成長促進效果は，水耕液の窒素の增加量或は有機態窒素の增加量に基くものでないことを明かにした。

終りに本研究に対し終始協力された吉田武君ならびに材料を提供された日本水産株式会社及び吉富製薬株式会社に感謝する。なお本研究は昭和 25 年度文部省科学研究費の補助により遂行した。

文　　献

1) 富山哲夫，米　康夫，石尾真彌：九州大学学芸雑誌，13，308 (1951).

2) 富山哲夫：1949 年 4 月東京に於ける水産学会にて発表.

3) 土屋靖彦，今井貞彦：日本農芸化学会誌，19，279 (1943).

肝臓の造血成分に関する研究——Ⅶ.
アオウキクサに対する数種造血成分の生長促進効果

米　康夫・富山哲夫

（九州大学農学部水産化学教室）

日本水産学会誌

第十八巻　第十二号　別刷

昭和二十八年四月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of

the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 18, No. 12, April, 1953

肝臓の造血成分に関する研究—Ⅶ.
アオウキクサに對する數種造血成分の生長促進効果*

米 康 夫・富山哲夫
(九州大学農学部水産化学教室)

Studies on Anianaemic Ingredients of the Liver—Ⅶ
The Growth-Promoting Effect of Several Antianaemic Substances upon *Lemna paucicostata* HEGELM.

Yasuo YONE and Tetuo TOMIYAMA

This paper deals with experiments which relate purified liver extracts to vitamin B_{12} and folic acid with regards to the effectiveness in promoting growth of *Lemna paucicostata* The results obtained can be summarized as follows:

1. Vitamin B_{12} was effective at 0.02 mg level per litre of New Jersey culture media whereas folic acid ineffective at 20 mg level per litre (Table 4, and Figs. 2 and 5).

2. The growth-promoting effect increased with repeating the adsorption of the whale-liver extract by the activated charcoal followed by the elution with a dilute alkaline solution (Table 2, and Figs. 1 and 2)

3. A concentrate obtained by repeating twice the adsorption and the elution was effective over levels higher than 0.4 mg per litre. The higher was the concentration, the greater the effect within range of concentrations studied (Table 3, and Figs. 3 and 4).

4. Based on the content of vitamin B_{12} and folic acid in liver and yields of the purified fraction, B_{12}, and folic acid from the liver, it was postulated that the active ingredient of the fraction seems to be neither B_{12} nor folic acid, but presumably be an unidentified vitamin.

緒 言

第6報に於て肝抽出物中にはアオウキクサの生長を促進する物質が含まれ，しかも有効物質は微酸性で活性炭に吸着されることを確認した。[1] 恐らくこの肝中の生長促進物質は抗貧血物質と同一又は類似のものではないかと推察される。他方著者等は肝中の抗貧血物質を微酸性で活性炭による吸着を繰りかえすことによつて濃縮し得た。[2] これらの結果から植物生長促進物質もまた活性炭吸着を繰りかえすことによつて濃縮できると推察される。依て本研究に於ては肝抽出物を活性炭によつて1回，2回及び6回吸着して得た各吸着物の生長促進効果を試験した。また活性炭吸着2回のものについて効果の量的差異を明かにした。他方最近肝臓から分離された抗貧血成分であるビタミン B_{12} 及び葉酸についてもアオウキクサの生長促進効果を試験し，活性炭吸着物の効果と対比した。

実験結果及び考察

1. 植物生長促進物質の濃縮

1952 年 2 月 19 日受理
* 昭和 25 年 10 月，長崎に於ける日本水産学会九州支部大会にて発表，
九州大学農学部水産学教室業績

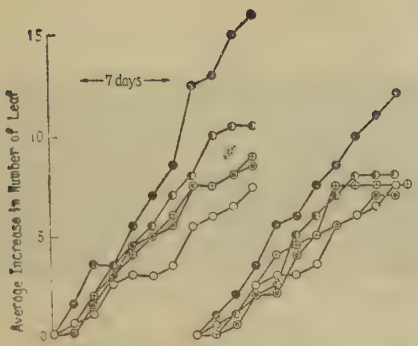


Fig. 1 Rate of growth of the plant with supplement of liver extract and adsorbed fraction.
Curves on the left side represent growth on 2 mg/L level; those on the right side represent growth on 0.4 mg/L Level.
The control, ○; liver extract, L_0, ◉; adsorbed fraction, L_1, ⊕; adsorbed fraction L_2, ◐; adsorbed fraction, L_6, ●.

実験に供した各試料は磨砕した長須鯨肝臓に適量の湯を加え，塩酸で pH 4.5 とし，約 50°C で数時間放置した後濾過し，濾液 L_0 に活性炭を加えて pH 4.5 で吸着し，水洗後苛性ソーダで吸着物 L_1 を溶出し，更に第1回活性炭吸着物 L_1 を pH 4.5 としてから活性炭吸着を行い吸着物 L_2 を分ち，順次に繰返し処理して L_6 を得た。なお各試料は中和後濃縮して用いた。各試料の組成は Table 1 に示す通りである。本実験に於ては肝抽出物 L_0，吸着物 L_1，吸着物 L_3 及び吸着物 L_6 をそれぞれ改変 New Jersey 水耕液 1L に乾燥物として 2 mg 添加区及び 0.4 mg 添加区をつくり，対照区には肝抽出物 2 mg に含まれる窒素量を硫酸アンモニヤの形で添加して比較した。実験の結果は Table 2, Figs. 1 及び 2 に示すように，0.4 mg の添加量では活性炭吸着6回の吸着物は顕著な効果を示し，吸着物 L_1 及び L_2 も葉の増加曲線及び終了日の乾燥重量についてみれば明らかに効果があり，肝抽出物 L_0 は対照と殆ど差がなかつた。又 2 mg の添加量ではいずれも顕著な効果を示し，且

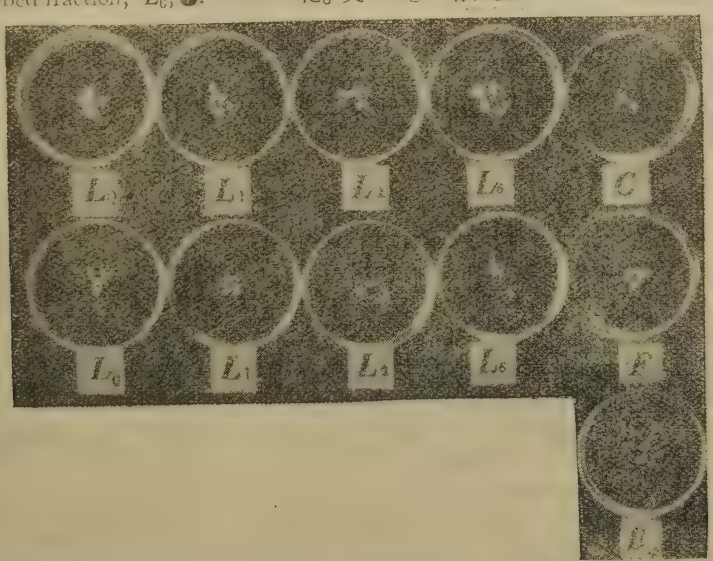


Fig. 2 Showing relative effectiveness of the liver concentrates, vitamin B_{12} and folic acid. C shows a control without supplement; F, folic acid (20 mg per L.); B_{12}, vitamin B_{12} (0.02 mg per L.); L_0, whale-liver extract; L_1, L_2 and L_6, liver extract purified by once, twice and sixth adsorption, respectively. L_0～L_6 shown in upper position were all supplemented at 2 mg level per L. and those shown in lower position, at 0.4 mg per L.

つ活性炭吸着を繰返すにしたがつてその効果が増大した。従つて肝臓中のアオウキクサの生長促進物質は抗貧血成分と同様に活性炭吸着をくりかえすことによつて濃縮されることが明かとなつた。

Table 1. The analytical data of the samples.

	L_0	L_1	L_2	L_6
Dry matter (%)	74.9	71.2	61.3	39.5
Total-N in wet matter (%)	9.8	6.3	4.1	0.7
Ash in wet matter (%)	7.9	21.8	21.9	22.1
NaCl in wet matter (%)	4.0	13.2	14.1	14.8

Table. 2 The effectiveness of the fraction adsorbed by activated charcoal (Date on experiment : Oct. 28～Nov. 17, 1950).

Kinds of supplements	$(NH_4)_2SO_4$	L_0	L_1	L_2	L_6	L_0	L_1	L_2	L_6
mg Dry matter added per L.	1.2	2.0	2.0	2.0	2.0	0.4	0.4	0.4	0.4
Added amt. as per cent of T-N	0.17	0.17	0.12	0.09	0.024	0.035	0.024	0.018	0.004
Increase in number of leaf	7 8	8 9	10 8	11 10	18 14	6 8	8 7	9 7	12 12
mg Dry leaf at end of exp.	2.2 2.6	2.9 3.1	3.2 2.9	3.7 3.5	5.5 5.1	2.2 2.6	2.8 2.5	2.9 2.6	3.7 3.6

Table 3. The effectiveness of the fraction adsorbed by activated charcoal (Date on experiment : Oct. 28～Nov. 17, 1950).

mg Dry matter per L.	$(NH_4)_2SO_4$ 1.2	4	2	0.4	0.2
Increase in number of leaf	7 8	14 10	13 9	10 11	4 8
mg Dry leaf at end of exp.	2.2 2.6	4.9 4.8	4.3 3.2	2.9 3.3	2.1 2.3

Table 4. The effectiveness of vitamin B_{12} and folic acid. (Date on experiment : Oct. 28～Nov. 17, 1950).

Kinds of supplements	$(NH_4)_2SO_4$	V•B_{12}	Folic acid
mg Dry matter per L.	1.2	0.02	20.0
Increase in number of leaf	7 8	18 14	8 8
mg Dry leaf at end of exp.	2.2 2.6	5.2 4.9	2.6 2.5

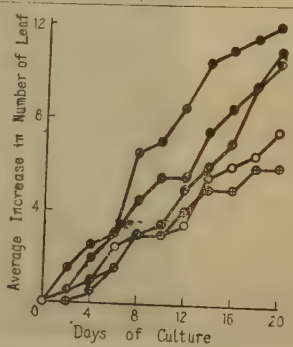


Fig. 3 Rate of growth of the plant with supplement of adsorbed fraction.

The control, ○ ; 0.2 mg/L adsorbed fraction, ⊕ ; 0.4 mg/L, ◐ ; 2 mg/L., ● ; 4 mg/L, ◉.

アオウキクサの生長に及ぼす活性炭吸着物の量的な効果を知ることは植物生長促進物質を精製分離する上に必要であるので，本実験に於ては改変 N.J. 液 1 L に活性炭吸着物 L_2 を乾燥物として 4 mg, 2 mg, 0.4 mg, 0.2 mg を添加して比較した。実験の結果は Table 3 及び Figs. 3 及び 4 に示すように 0.2 mg では殆ど効果は認められなかつたが，0.4 mg 以上では対照に比して著るしい効果を示し，且つ本実験の範囲では添量加を増すにしたがつて生長促進効果は増大した。

2. ビタミン B_{12} 及び葉酸の効果

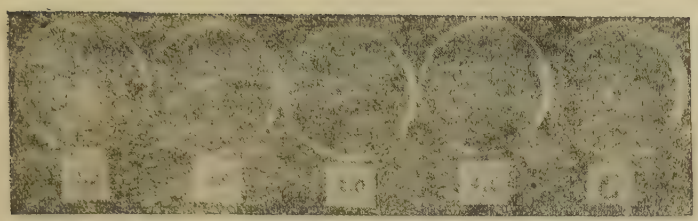


Fig. 4 Showing effectiveness of liver concentrate, L_2 at varying levels. Figures given are number of mg supplemented to one litre of the culture medium. C shows a control without supplement.

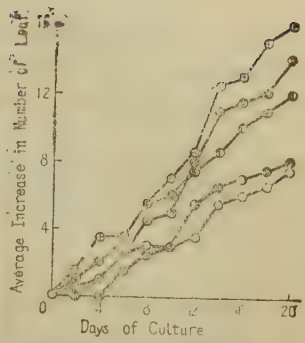


Fig. 5 Rate of growth of the plant with supplement of vitamin B_{12} and folic acid.
The control, ○ ; 0.02 mg/L vitamin B_{12}, ◉ ; 20 mg/L folic acid ◒ ; 0.4mg /L adsorbed fraction L_6, ◐ ; 2 mg/L adsorbed fraction L_6, ⊕.

試験区には水耕液 1L に市販のビタミン B_{12}（フレスミン）0.02 mg 又び葉酸（フオリアミン）20 mg を添加し，無添加の対照区と比較した。実験の結果は Table 4, Figs. 2 及び 5 に示すようにビタミン B_{12} は 0.02 mg で著るしい効果を示したが，葉酸は本実験に用いた量 20 mg では対照と差が認められなかつた，然し乍ら葉酸については唯一回の実験であるし，又単一量についてのみ行つた実験であるから，全く効果がないかは将来の研究で決定したい。なお本実験は 1) 項の実験と同時に行つたので，1) 項に記載した活性炭吸着物 L_6 の 2 mg 及び 0.4 mg 添加量の成績と比較すると，ビタミン B_{12} 0.02 mg の効果は L_6 の 2 mg（無灰物として 0.88 mg）及び 0.4 mg（無灰物として 0.176 mg）の効果の中間に相当する。しかるに L_6 の 2mg は新鮮肝臓 4.5 g より得られたものであるから，B_{12} 及び葉酸が完全に活性炭に吸着され，また稀アルカル液で溶出されたと仮定して，Thompson 氏等[3] 或は Lewis 氏等[4] による牛肝の B_{12} 定量値（0.016 mg%）及び Reyniers 氏等[5] による鶏肝の葉酸定量値（平均 0.20 mg %）から換算すると，B_{12} は 7.2×10^{-4} mg，葉酸は 9.0×10^{-3} mg が L_6 の 2 mg 中に含まれる計算になる。他方，最近著者等の活性炭吸着法及び溶出法につき吟味した結果によると，B_{12} は活性炭吸着後に稀アルカリ液で溶出した場合には僅かに 3 %程度しか回収できないし，葉酸も 11 % 回収されるに過ぎないことを確認した[6]。之等の回収率の補正を行えば，L_6 の 2 mg 中には B_{12} の 2.2×10^{-5} mg 及び葉酸の 9.9×10^{-4} mg 以下の痕跡を含むに過ぎないことになる。依て活性炭吸着物の植物生長促進作用は未知の抗貧血物質の作用と考えざるをえない。純粋に分離した新抗貧血物質のアオウキクサ成長促進効果については，最近確認しえたので近く報告する予定である。

総　　括

1) ビタミン B_{12} は水耕液 1L に対し 0.02 mg で顕著なアオウキクサ生長促進効果を示したが，葉酸は水耕液 1L に対し 20 mg では効果を示さなかつた。

2) ナガスクジラ肝臓中のアオウキクサ生長促進物質は活性炭による吸着と稀アルカリ水溶液による溶出とを繰り返すに従つて濃縮される。

3) 肝抽出物の活性炭二回吸着物は水耕液 1L に対し 0.4 mg（無灰物として 0.26 mg）以上で効果を示し且つ本実験の範囲では添加量を増すにしたがつて生長促進効果が増大した。

---

3),4) Thompson 氏等は microbial assay により，Lewis 氏等は Ratassay によつて，新鮮牛肝の B_{12} を定量した結果は，乾物 100 g 当りそれぞれ 47 γ 及び 50 γ であつた。

4) 肝よりの活性炭吸着物の収量，肝の B_{12} 及び葉酸含量，及び B_{12} 並に葉酸の吸着率と溶出率とから活性炭吸着物中の B_{12} 及び葉酸量を計算すると，吸着物のアオウキクサ成長効果は B_{12} 及び葉酸の効果でになく，未知ビタミンの効果と推定される。

終りに，研究材料を提供された日本水産株式会社及び吉富製薬株式会社，並に培養試験に助力された吉田武君に感謝の意を表する。なお本研究は昭和 25 年度科学研究費で支弁した。

文　　献

1. 米康夫，富山哲夫：日水会誌. **18**, 659 (1953).
2. 富山哲夫，米康夫，堀口吉重：昭和 23 年 11 月福岡に於ける栄養食糧学会九州支部例会にて発表.
3. Thompson, H.T., Dietrich, L.S. and Elvehjem, C.A.: *J. Biol. Chem.*, **184**, 175 (1950).
4. Lewis, U.J., Register, U.D., Thompson, H.T. and Elvehjem, C.A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **72**. 479 (1949).
5. Reyniers, J.A., Trexler, P.C., Ervin, R.F., Wagner, M., Gordon, H.A., Luckay, T.D. Brown, R.A., Manning, G.J. and Campbell, C.J.: *J. Nutrition*, **41**, 31 (1950).
6. 富山哲夫，米康夫，広渡一之：昭和 26 年 11 月，福岡に於ける日本水産学会九州支部大会にて発表.

肝臓の造血成分に関する研究—Ⅷ. 肝精製物のプロミン貧血に対する抑制効果*

米 康 夫・富 山 哲 夫
(九州大学農学部水産化学教室)

Studies on Antianaemic Ingredients of the Liver—Ⅷ. Alleviative Effect on Promin-induced Anaemia due to Administration of Vitamin B_{12} and of a Purified Fraction of Liver

Yasuo YONE and Tetuo TOMIYAMA

It has been reported by ERSHOFF and MCWILLIAMS[3] that a whole liver was effective to reduce a toxicity due to promin. The present paper deals with an investigation of a factor or factors responsible for alleviating promin-induced anaemia.

In the present study, an experimental anaemia in albino rat was induced by intraperitoneal administration on four successive days of 0.2 cc aqueous solution of a 30 per cent diaminodiphenyl sulfonate per 100 g body-weight. Daily supplementation of antianaemic factors was made during an entire experimental period.

Two kinds of antianaemic factors from liver have been used:

1) crystalline vitamin B_{12}, a commercial preparation "fresmin";

2) a purified liver fraction which was prepared by eluting with a dilute sodium hydroxide solution an adsorbate of a solubilized fraction of whale liver on an activated charcoal.

A noticeable alleviative effect has been observed when the purified liver fraction was orally administered at a level of 100 mg on dry basis (equivalent to 5 g fresh liver) per 100 g body-weight of albino rat, while no effect below a 40-mg level. Vitamin B_{12} was also effective when subcutaneously injected at 0.5-microgram level per 100 g body-weight, whereas not effective when orally administered at levels below 3 micrograms. Since vitamin B_{12} content of the purified fraction was found by using Euglena method to be less than about 0.0035 microgram per 100 mg of dried matter, it can be concluded that the alleviative effect manifested by the fraction is not due to vitamin B_{12}.

Ⅰ 緒 言

1943 年に Faget 氏等[1] により癩のプロミン療法が初めて報告されて以来，諸所の療養所に於て本剤が広く治療に用いられ，最近五ケ年間の投与結果によると従来採用されたものゝ内では最も推奨すべき療法であることが明かとなつた。しかし本剤を連日投与すると屢々貧血を伴うことが観察され，その対策としては最近肝製剤の投与が有効であると報告されている[2]。しかしこれらの報告には全て詳細な血球数の変動値が記

* 本報告の大要は昭和 25 年 10 月，長崎に於ける日本水産学会九州支部大会に発表した。九州大学農学部水産学教室業績．1953 年 8 月 12 日受理（印刷費負担）

試されていない。一方 Ershoff 氏等[3] 及び Higgins 氏[4] は白鼠に対するプロミンの毒性に肝臓粉末の経口又与が有效であると報告しているが，プロミンによる貧血に対する效果については充分検討していない。

著者等[5] はさきに著者の一人富山の液化法により調製した肝抽出物が Phenylhydrazine 貧血に対して抑制的に作用することを報告した。プロミン貧血の原因がヒドラチン貧血のそれと類似のものであれば，著者等の活性炭吸着法により精製した肝精製物はプロミン貧血に対して抑制效果を示すと思われる。依て白鼠を用いて試験したところ，プロミンによる赤血球数の減少は肝精製物の投与によつて明かに抑制された。

次に肝精製物の效果が肝中のビタミン B_{12} によるものか否かを検討した。その結果はビタミン B_{12} も同様にプロミン貧血抑制效果を示したが，しかしプロミン貧血の抑制には比較的多量の B_{12} の経口投与を要すること及び肝精製物には B_{12} を殆ど含まないことから，著者等の肝精製物の效果は B_{12} によるのではなく，未知成分によることを明かにしたのでこゝに報告する。

Ⅱ 実 験 方 法

使用したラツテはすべて体重 200 g 以上の雄であつて，玄米粉 55，米糠 5，大豆粕 30，酵母 2，乳酸石灰 2.5，食塩 0.5，菜種油 5 及び肝油（10,000 IU）0.5 よりなる合成飼料を用いて予め一週間飼育した正常のものである。

プロミン貧血は白鼠の体重 100 g 当り 0.2 cc のプロミン注射液（Diaminodiphenyl sulphonate の 30% 水溶液）を 4 日間毎日腹腔内に注射することにより起させた。試料の投与はプロミン注射開始と同時に始め，毎日一回エーテル麻酔のラツテにゾンデで径口投与した。なお連続エーテル麻酔が赤血球数にどの程度の影響を与えるかにつき四日間に亙り測定した結果は，試験前 837 万のものが 958 万，834 万，840 万と変動した程度であつた。

抑制效果の判定は，プロミン注射開始後約 10 日間の赤血球数の減少率が試料を与えない対照区と比較して小なるものを有效と認めた。赤血球数はラツテの尾部静脈をカミソリの刃を用いて傷つけ，湧出する血液を用い，Thoma-Zeiss の Haematitometer によつて計数し，1 cmm 中の赤血球数を以て示した。なお採血による貧血を最小限に止めるために，採血後に塩化第二鉄溶液を傷口に塗付して止血した。

Ⅲ 結 果 及 び 考 察

1. ナガスクジラの肝精製物の效果

実験に供した肝精製物はナガスクジラ肝を磨砕して粥状としたものに適量の湯及び塩酸を加えて微酸性にし，50～55°C で数時間放置後濾過し，濾液に活性炭を加え充分振盪した後，稀苛性ソーダ液で溶出したものである。

この肝精製物のプロミン貧血に対する抑制效果をみるには，白鼠の体重 100 g 当りに乾燥物として 20，40，100 及び 200 mg の肝精製物を実験方法の項に記載した要領で毎日径口投与した。なおプロミン貧血の進行中に於ける赤血球数の最も確らしい値を知る必要がある。依て無投与の対照区は 11 尾，肝精製物 20 mg 区は 2 尾，100 mg 区は 3 尾，40 mg区及び 200 mg 区は 4 尾のラツテを用い，各ラツテにつき得られた結果の平均をとつてみた。この場合の抑制效果は Fig. 1 に示したように 20 mg 及び 40 mg 投与区は無投与の対照区と殆ど差を示さなかつたが，100 mg（生肝 5 g 相当量）区及び 200 mg 区は明

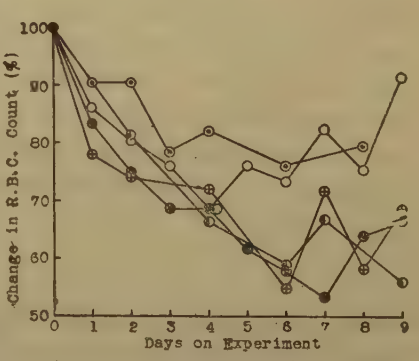


Fig. 1 The effectiveness on promin-anaemia of the purified liver fraction at varying levels. Control, ●; 20 mg, ◐; 40 mg, ⊕; 100 mg, ◉; 200 mg, ○

むな貧血抑制效果を示した。

次に，肝精製物を 100 mg 投与した場合に著るしい抑制效果を示したのは，この精製物中のビタミン B_{12}（以下 V.B_{12} と略記）或いは葉酸の效果によるのではないかとの疑問が起る。依て V.B_{12} の效果について研究を進めた。なお葉酸の效果については次報に於て明かにしたい。

2. ビタミン B_{12} の效果

先ず白鼠の体重 100 mg 当り 5γ，3γ 及び 1.5γ の V. B_{12} を実験方法の項に記載した要領で径口投与した。対照区は 4 尾，5γ 投与区及び 3γ 投与区は 3 尾，1.5γ 投与区は 2 尾のラッテを用いた。なお使用した V.B_{12} は武田薬品工業 K.K の市販品フレスミンである。結果は Fig. 2 に示すように 5γ で僅かに抑制效果がみられたが，3γ 以下では無效であつた。

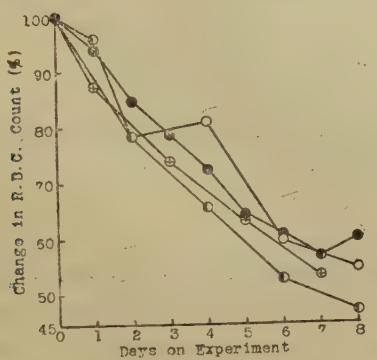


Fig. 2 The effectiveness on prominanaemia of vitamin B_{12} orally administered. Control, ●; 1.5γ, ◐; 3γ, ⊕; 5γ, ○

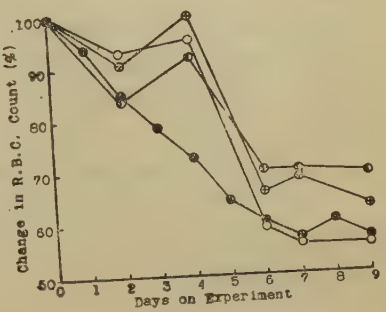


Fig. 3 The effectiveness on prominanaemia of vitamin B_{12} subcutaneously injected. Control, ●; 0.5γ, ◐; 1γ, ⊕; 2.5γ, ○

V.B_{12} の抗貧血效果は径口投与と注射とでかなり差異を示すことが知られているので[6]，白鼠の体重 100 g 当り 2.5γ，1γ 及び 0.5γ の V.B_{12} を毎日一回皮下注射し，無投与の対照区と比較した。なお対照区，V.B_{12} 0.5γ 及び 1γ 注射区はいずれも 2 尾，2.5γ 注射区は 3 尾のラッテを用いた。実験の結果は Fig. 3 にみられるように，非径口の場合には 0.5γ の投与によつても著るしい抑制效果がみられた。

他方，径口投与の場合には，前述のように 5γ で僅かな抑制效果を示したので，肝精製物 100 mg が示した著るしい抑制效果は肝精製物中の V.B_{12} の效果によるのではないかとの疑問が起る。依て著者等は Euglena 法を用いて肝精製物中の V. B_{12} 含量を測定した結果，肝精製物の乾燥量 100 mg 中の V. B_{12} 含量は 0.0035γ 以下であつた。従つて肝精製物の效果は V.B_{12} 以外の有效成分によることが明かである。

Ⅳ 総　　括

1. 白鼠の体重 100 g 当り 0.2 cc のプロミン注射液を 4 日間毎日腹腔内に注射して起したプロミン貧血に対して，肝精製物及び V.B_{12} がどの程度の抑制效果を示すかについて実験した。

2. ナガスクジラ肝の消化抽出物を活性炭で吸着し，次に稀アルカリで溶出した精製物は，白鼠の体重 100 g 当り乾物として 40 mg（生肝 2 g 相当量）以下の径口投与ではプロミン貧血を抑制する效果を示さなかつたが，100 mg（生肝 5 g 相当量）以上では顕著な抑制效果を示した。

3. V.B_{12} は径口投与の場合，5γ で僅かな抑制效果を示したが，3γ 以下では全く效果を示さなかつた。しかし皮下注射の場合には 0.5γ でも顕著な抑制效果を示した。

4. Euglena 法を用いて肝精製物中の V. B_{12} 量を測定した結果，乾燥物 100 mg 中の V. B_{12} 量は

0.0035γ 以下であつた。従つて肝精製物のプロミン貧血抑制效果は V. B_{12} 以外の有效成分によることが明かである。

終りに本研究に多大の援助を与えられた吉富製薬株式会社に対し深謝の意を表する。また研究の遂行に助力された合屋正氏，土井良平次郎氏及び横溝裕氏に感謝する。なお本研究の一部は昭和 25 年度科学研究費で支弁した。

V 文 献

1. Faget, G. H., Pogge, R. C., Johansen, F. A., Dinan, J. F., Prejean, B. M. and Eccles, C. G.: Pub. Health Rep. **58**, 1729 (1943).
2. Faget, G. H. and Erickson, P. T.: J. Amer. Med. Assoc., **136**, 451 (1948).
守屋睦夫：皮膚と泌尿，**12**, 92 (1950).
3. Ershoff, B. H. and Mc Williams, H. B.: J. Amer. Pharm. Assoc., **33**, 274 (1949).
4. Higgins, G. M.: Amer. J. Clin. Path., **14**, 278 (1944).
5. 米康夫，富山哲夫：本誌，**17**, 27 (1951).
——，——：本誌，**17**, 33 (1951).
6. Zucker, T. F. and Zucker, L. M.: Vitamins and Hormones, Ⅷ. p. 25 (1950), Academic Press Inc., New York.

肝臓の造血成分に関する研究—Ⅸ. プロミン貧血に対する葉酸の効果及び葉酸と肝精製物或いはビタミン B_{12} との併用効果*

米 康夫・富山哲夫
(九州大学農学部水産化学教室)

Studies on Antianaemic Ingredients of the Liver—Ⅸ. Alleviative Effect on Promin-induced Anaemia due to Folic Acid and to a Combination of Folic Acid with Vitamin B_{12} or a Purified Liver Fraction

Yasuo YONE and Tetuo TOMIYAMA

In a preceding paper[1], it has been reported that a purified fraction of whale liver at a 5-g fresh liver level was effective to alleviate promin-induced anaemia, and that its effect was not apparently due to vitamin B_{12} from a 5-g portion of fresh liver.

Experiments have been carried out to see whether promin-induced anaemia be alleviated by administration of folic acid. The interrelationships between folic acid, vitamin B_{12} and a purified liver fraction have also been studied. The results obtained can be summarized as follows:

1. Folic acid was not effective when administered, whether orally or injected, at a 10-mg level per 100 g body-weight of albino rat (Fig. 1).

2. The purified liver fraction at its ineffective level, i.e., a 40-mg level (equivalent to 2.0 g fresh liver) showed a marked effect when supplemented with 1.5 mg of folic acid. A combination of a 1.5-microgram level of vitamin B_{12} with 1.5 mg of folic acid was somwhat effective, though each level alone has been confirmed to be ineffective (Fig. 2).

3. Data presented here suggest that the purified fraction of whale liver contains apparently an unidentified antianaemic factor which is responsible for alleviating the promin-induced anaemia.

Ⅰ 緒 言

著者等は第8報[1]に於て活性炭吸着法により精製した肝精製物が白鼠のプロミン貧血を抑制することを認め，またその肝精製物の抑制効果は V. B_{12} によるものではないことを確かめた。

この肝精製物の示すプロミン貧血抑制効果が如何なる成分に由来するかを知る目的を以て，本実験では肝の抗貧血成分の一つである葉酸が同様な抑制効果を示すかについて研究を進めた。その結果は本実験に於て

* 本報の大要は昭和 25 年 10 月，長崎に於ける日本水産学会九州支部大会に発表した。九州大学農学部水産学教室業績
1953 年 8 月 12 日受理（印刷費負担）

使用した量では效果がみられなかつた。更にこれらの抗貧血物質の間に如何なる関連性があるかについて探究を進めたところ，B_{12} 及び葉酸以外に肝精製物中に未知の抗貧血物質が存在し，しかも葉酸と共存することによつて效果の増大することが確められた。

II 実驗結果及び考察

1. 葉酸の效果

白鼠の体重 100 g 当り 10 mg，5 mg，及び 1.5 mg の葉酸を毎日エーテル麻酔後にゾンデで径口投与した区及び 10 mg の葉酸を毎日皮下注射した区を設け，無投与の対照区と比較した。実驗方法は第3報に記載した方法と同じである。なお使用した葉酸は武田藥品工業 K.K の市販品（ホリアミン）である。実驗の結果は Table 1 及び Fig. 1 にみられるように，径口投与或いは皮下注射のいづれでも 10 mg 以下では無效であつた。

2. 肝精製物，ビタミン B_{12} 及び葉酸の相互関連性

最近抗貧血成分の研究が急速に進展した結果，抗貧血成分の多元性が漸く認められるようになり，数種の成分が相関連して造血機構に関与しているものと推察されるに至つた[2]。依てプロミン貧血抑制に対して V. B_{12}，葉酸及び肝精製物が互に補強作用を呈するか否かについて試驗を行つた。この点を明かにするために，第3報に於て效果が認められなかつた肝精製物量（乾物として 40 mg）を基準として，之に葉酸の無效量 1.5 mg を径口的に併用した区及び葉酸 1.5 mg に V. B_{12} の無效量 1.5 γ を径口的に併用投与した区を設け，単独投与の效果に比してどの程度の差があるかを吟味してみた。なお肝精製物及び V. B_{12} は第8報の実驗に使用したものと同じである。

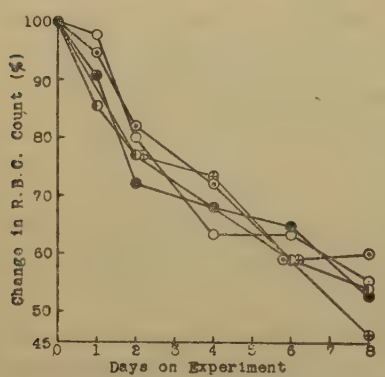


Fig. 1 The effect of administration of folic acid on promin-anaemia, control, ●. Oral administration: 10 mg, ◉; 5 mg, ⊕; 1.5 mg, ◐; Subcutaneous: 10 mg, ○

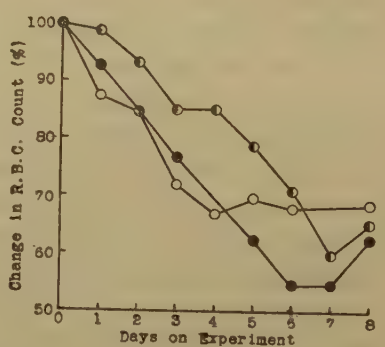


Fig. 2 A synergistic effect of folic acid on the purified liver fraction and vitamin B_{12}. Purified fraction plus PGA, ◐; V. B_{12} plus PGA, ○; Control. ●

実驗結果は Table 2 及び Fig. 2 に示したように，肝精製物 40 mg と葉酸 1.5 mg とを併用した区は著るしい抑制效果を示した。肝精製物 40 mg 及び葉酸 1.5 mg はいづれも単用の場合には全く無效であつたので，併用区の著明な效果は葉酸の相乗效果と認めざるをえない。他方 V. B_{12} 1.5 γ と葉酸 1.5 mg の併用区にも多少抑制效果がみられた。しかし肝精製物 40 mg 中には第8報に示したように V. B_{12} は殆ど含まれてなかつたことから考えると，肝精製物 40 mg と葉酸との併用区の效果はこの肝精製物の B_{12} と葉酸との協同效果とは考えられない。

Table 1. The effectiveness of oral and subcutaneous administration of folic acid upon change in red blood cell count of promin-adm. rat.

Mode of administration	Body weight of albino rat	mg Folic acid per 100 g body weight	Red blood cell count (million per cmm)					
			Before injection	Days after injection				
				1	2	4	6	8
Oral	376	0	880	800	632	596	542	466
	387	1.5	808	726	624	612	502	428
	396		886	722	686	548	501	484
	318	5.0	863	—	666	632	507	392
	345	10.0	840	795	690	610	498	514
Subcutaneous	157	10.0	876	858	704	556	556	478

Table 2. The effect on promin-anaemia of a combination of folic acid with vitamin B_{12} and with the purified fraction of liver.

Kinds of supplements	Body-weight of albino rat	Red blood cell count (million per cmm)							
		Before administration	Days after injection						
			1	2	3	4	5	6	7	8
No supplement	328	936	896	—	798	—	687	—	569	474
	332	852	791	—	591	—	448	500	424	—
	318	937	—	734	—	632	—	494	—	673
Purified fraction	161	734	694	698	594	—	606	—	598	—
	268	883	1048	—	912	—	883	—	516	592
	288	784	902	—	777	—	660	—	469	544
	305	814	838	—	634	—	—	642	—	544
	300	963	—	898	—	728	—	480	—	560
	260	896	808	—	748	—	706	—	596	—
	314	914	784	—	702	—	502	440	360	—
1.5 mg PGA plus 1.5 γV. B_{12}	205	798	730	596	—	518	560	612	—	642
	185	802	742	772	604	608	612	686	—	746
	278	830	—	708	—	480	—	434	—	440
	302	923	—	772	—	630	—	553	—	467

他方，肝精製物中の葉酸量について未だ定量していないが，肝中の葉酸の全部がこの肝精製物中に含まれると仮定して，Teply 氏等[3]，Sreenivason 氏等[4]，或いは Pfiffner 氏等[5] による牛肝の葉酸定量値（40～400 γ%）から換算すると，精製物 40 mg 及び 100 mg 中にはそれぞれ 0.8～8 γ 及び 2～20 γ の葉酸含量に過ぎないことになる。しかも活性炭吸着及び溶出操作に於ける葉酸の行動からみると[6]，肝中の葉酸の約 10 %以下が精製物に含まれるに過ぎないであろう。従て肝精製物の効果は明かに精製物中の葉酸のみによるものでもなく，また肝精製物中の或有效成分と葉酸との相乘效果とも考え難い。以上の考察によつて肝精製物の有效成分は未知の有效成分であるとみるのが妥当である。

Ⅲ 総　　括

プロミン貧血に対する葉酸の示す抑制效果並びに肝精製物とビタミン B_{12} 或は葉酸との関連性について実驗し，次のような結果をえた。

1. 葉酸は経口投与，皮下投与のいずれの場合にも白鼠体重 100 g 当り 10 mg では無效であつた。

2. 肝精製物に葉酸を加えた場合の效果は，それぞれ単独投与した場合よりも著るしく抑制效果が大であつた。

3. ビタミン B_{12} に葉酸を加えた場合にも，多少抑制效果が認められたが，精製物中の B_{12} 含量から判断すると肝精製物中にはこの種の相乗效果は期待されない。

4. 以上の実験結果は著者等の肝精製物中にはビタミン B_{12} 及び葉酸以外に未知の抗貧血因子を含んでいるとの根拠を与えた。

終りに本研究に多大の援助を与えられた吉富製薬株式会社に対し深謝の意を表する。また研究に助力された土井良平次郎氏及び横溝裕氏に感謝する。なお本研究の一部は昭和 25 年度科学研究費で支弁した。

Ⅳ 文　　献

1) 米康夫・富山哲夫：本誌，**19**, 669 (1953).
2) Vilter, R. W. et al: Blood, **5**, 695 (1950).
3) Teply, L. J. and Elvehjem, C. A.: J. Biol Chem. **157**, 303 (1945).
4) Sreenivason, A., Harper, A. E., and Elvehjem, C. A.: J. Biol. Chem. **177**, 117 (1949).
5) Pfiffner, J. J., Binkley, S. B., Bloom, E. S. and O'Dell, B. L.: J. Amer. Chem. Soc. **69**, 1476 (1947).
6) Tomiyama, T. and Yone, Y.: Proc. Jap. Acad. **29**, 178 (1953).

[From Proceedings of the Japan Academy, Vol. 29 (1953), No. 4]

44. A New Chick Growth Promoting Factor in Liver

By Tetuo TOMIYAMA and Yasuo YONE
Department of Fishery Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University
(Comm. by Y. OKUDA, M.J.A., April 13, 1953)

There is no question but that crystalline B_{12} will increase the growth rate of chicks fed all-vegetable protein ration[1]. So, several unidentified growth factors postulated prior to the isolation of vitamin B_{12} should be revised of the possible identity with this pure vitamin. More recent studies[2] have presented evidence that an unidentified factor, or factors, associated with animal protein materials, is required in addition to B_{12} for maximum chick growth. Little information, however, is available on the isolation of unidentified factors in liver.

The authors have been carrying out, since 1945, the fractionation and purification of the antianaemic factor in liver. In 1950, a report was presented of a colorless crystal which gave the rat-reticulocyte response and was termed as vitamin B_{15} until its chemical structure would be elucidated[3]. It has also been reported that growth of a water plant, *Lemna paucicostata* HEGELM, was stimulated by adding to a basal medium vitamin B_{15} concentrate from whale liver[4]. The present communication deals with a new chick growth factor in the vitamin B_{15} concentrate which is nearly free from vitamin B_{12} and folic acid.

Experimental Procedure

1. *The Preparation of vitamin* B_{15} *concentrate from liver.* 11.4 liters of the filtrate from 6 kg beef liver solubilized by Tomiyama's method[5], were adjusted to pH 4 and treated with 570 gm of an activated charcoal for 30 minutes with stirring. The filtrate from the charcoal was treated with an additional 570 gm of the charcoal, and the residues were combined. The combined residue was washed with 5 liters of water acidulated with hydrochloric acid. The elution was carried out by treating the charcoal at pH 9 with 5 liters of a dilute sodium hydroxide solution for 30 minutes with stirring. The adsorption on and elution from charcoal was further repeated. The colorless eluate obtained from 100 gm raw liver contained 14.5 mμg of vitamin B_{12} activity by the *Euglena* method.

2. *The chick growth assay of preparations.* Day-old single comb white Leghorn male chicks hatched from eggs obtained from hens fed a normal diet were used in these experiments. The experimental groups were housed in electrically heated brooders with raised screen floors. The chicks were leg-banded and were weighed individually at

weekly intervals. Feed and water were supplied *ad libitum*. All the purified supplements were dissolved in a 50% ethanol solution and stored in a refrigerator. Mixing of various supplements with the basal ration was made at frequent intervals.

Results and Discussions

1. *The behavior of vitamin* B_{12} *and folic acid in the purification procedure.* It will be seen that the purification procedure is not much different from that usually employed except use of an aqueous alkaline solution as elution solvent instead of an ammoniacal ethanol. It is to be mentioned that lack of ethanol in authors' laboratory during the World War II forced to omit the use of ethanol and resulted in a successful elution from charcoal an active factor responsible for the rat-reticulocyte response. Since crystalline vitamin B_{12} and folic acid have recently become available, this elution procedure has been scrutinized with results presented in Fig. 1. It will be seen that elution of vitamin B_{12} can be carried out easily with an alcoholic alkaline solution, while very difficultly with an aqueous alkaline solution. It is to be noted that the efficiency of elution of B_{12} varies appreciably with kinds and concentration of alcohol. It has already been indicated that vitamin B_{15} activity as measured by *Lemna* growth response[4], can easily be eluted from the adsorbate with an aqueous alkaline solution. Consequently, evidence has been obtained that only the adsorption on and elution from charcoal without using any alcohol resulted in a vitamin B_{15} concentrate which is free from B_{12} and folic acid.

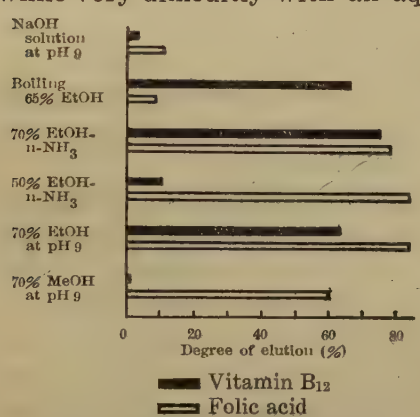


Fig. 1. Elution of vitamin B_{12} and folic acid from activated charcoal with various solvents

2. *Chick growth response to vitamin* B_{15} *concentrate.* Data presented in Table I clearly indicate that vitamin B_{15} concentrate is capable of stimulating growth of chicks at greater levels than that equivalent to 177 gm of fresh raw liver. The bioassay for B_{12} by the *Euglena* method showed that only about 1/400 of B_{12} required for optimum growth of chick was present in the concentrate equivalent to 177 gm raw liver. The difference in gain in body weight between supplemented and unsupplemented group was significant at 5% level. A supplement of 15μg B_{12} per kg diet seemed to improve the growth performance to some extent, but this improvement was not statistically significant. On the basis of these experimental results, it is

Table I

The growth response of chicks to vitamin B_{15} and vitamin B_{15} concentrate

Supplements	Amount of supplements per kg diet Dry basis (mg)[1]	B_{12} μg per kg diet	Average body weight in gm of 25-birds each			"t" test	Total gain in weight over total feed intake (%)
			Initial	After 3 weeks	Average gain		
None[3]			39.6±0.5[2]	137.4±3.9[2]	97.7±3.8[2]		31.7
V.B_{15} concentrate	910[4]	0.0241	39.6±0.5	136.2±3.8	96.6±3.8		34.4
	1820[5]	0.0482	39.4±0.5	148.3±3.7	108.9±3.5	2.1	33.7
	3640[6]	0.0964	39.7±0.5	151.3±3.8	111.6±3.7	2.6	37.2
V.B_{12}[7]		15.0	39.7±0.5	147.4±3.6	107.7±3.5	1.9	37.1

1) Ash in the dry matter was 37.9 per cent. 2) Standard error of the mean 3) Basal diet used was composed, in per cent, of soybean meal (expellor-processed) 30, ground yellow corn 28, ground wheat 28, rice bran 10, $CaCO_3$ 3, liver oil (vitamin A 1,000 I.U. and D 100 I.U. per gm) 1; to each kg of this mixture, manganized salt 0.5 gm, lecithine 10 gm, folic acid 4 mg and 2-methyl-1,4-naphthoquinone 1 mg were added. 4) 5) 6) Equivalent to 88.5 gm, 177 gm and 354 gm raw liver, respectively 7) "Normocytin" of Lederle Laboratories

evident that vitamin B_{15} concentrate can replace vitamin B_{12} in stimulating growth of chicks fed all-vegetable ration. Furthermore, increase in feed efficiency by supplementing with B_{15} concentrate as well as B_{12} suggests that the factor under question may most likely involved in either efficient protein-or energy-metabolism.

3. *Chick growth response to various liver fractions in addition to* B_{15} *concentrate.* A comparative study was made of chick growth responses to whole liver, solubilized liver, B_{12}, and B_{15} concentrate. It is clear from Table II that the solubilized liver, from which the new factor was concentrated, contains growth factors at nearly the same level as found in whole liver. This is evidenced by a result that the insoluble residue does neither possess *per se* any growth factor, nor accentuate the chick growth response to the solubilized fraction of liver. The present data suggest that some of unidentified factors in a conjugated form may be brought into solution by the autolysis.

The effect of vitamin B_{12} supplement at 25 μg per kg of diet was not appreciable after 3 weeks. The difference in gain in body weight of B_{12} supplemented group *vs* control group was not statistically significant. Little response of chicks to vitamin B_{12} encountered in this study might possibly be due to a plenty of storage of growth factors in chicks used in these studies. However, addition of vitamin B_{15} concentrate at a level equivalent to 150 gm raw liver resulted in a significant increase in rate of growth of chicks. The difference between supplemented and control group was significant at 5% level. Vitamin B_{12} seemed not to exert any synergistic effect to this new

Table II

Chick growth response to whole liver, solubilized liver, insoluble residue, vitamin B_{15} concentrate, vitamin B_{12}, and folic acid

No. of group	No. of chicks	Kinds of supplements	Level[2] of supplements per kg diet Dry basis (gm)	Average body weight in gm				"t" test	Feed efficiency
				Initial	Weekly increase				
					1	2	3		
1	10	Whole liver powder	38.4	43.1±0.8[1]	39.9	102.4	167.5±4.6[1]		50.4
2	10	Solubilized plus insoluble	16.3+12.0	43.5±0.8	37.9	97.6	166.4±5.4		49.4
3	10	Solubilized liver	16.3	41.9±0.9	35.6	98.3	167.0±3.4		51.9
4	9	Insoluble residue	12.0	42.4±1.5	30.7	60.9	108.0±5.0		42.4
5	9	Basal diet[3]		43.2±1.4	31.7	70.3	113.1±4.3		43.6
6	9	B_{12} plus B_{15} concentrate	25μg+1.0	42.7±1.0	30.5	77.8	136.8±3.4	4.57	48.4
7	10	B_{12}[4] alone	25μg	43.1±0.9	28.6	69.7	121.1±4.8	1.27	42.2
8	10	B_{15} concentrate	1.0	42.5±1.0	34.4	77.2	139.1±8.2	2.83	48.2
9	9	B_{15} concentrate plus PGA	1.0+4mg	42.6±0.8	34.3	81.9	115.9±3.1	0.57	42.7
10	10	PGA alone	4mg	41.7±1.5	31.1	67.2	97.1±4.8		40.2

1) Standard error of the mean 2) 150gm raw liver-equivalent 3) The basal diet used for assay of various purified supplements contained, in per cent, soybean meal (solvent-extracted) 35, ground brown rice 55, rice bran 5, $CaCO_3$ 3, liver oil 1, lecithine 1; to each kg of this mixture, manganized salt 0.5 gm, folic acid 4 mg and 2-methyl-1,4-naphthoquinone 1 mg were added. On assay of crude samples, soybean content of the diet was decreased with increase in protein contents of supplements in order to equalize protein level between each group. 4) "Normocytin" of Lederle Laboratories

factor. A combination of folic acid with vitamin B_{15} concentrate accentuated the chick growth until 2-week feeding, followed with a severe perosis whereby gain in weight decreased considerably. It can be presumed that vitamin B_{15} concentrate may contain some leucovorin, since procedures for preparation of these two vitamins are similar. However, Broquist et al. and Sauberlich[6] have already indicated that leucovorin is nearly equivalent to folic acid in promoting chick growth. The fact that the chick growth response to vitamin B_{12} plus vitamin B_{15} concentrate was not maximal, appeared to suggest the presence of some other unknown factors in whole liver. However, a further work is needed to determine whether or not there exist unknown factors other than B_{12} and B_{15}, for the basal diet used was low in riboflavin level.

Summary

1. A purified colorless fraction from liver, vitamin B_{15} concentrate, has been prepared by repeating a procedure of the adsorption on activated charcoal followed with elution with an aqueous dilute alkaline solution. An evidence has been presented of the effective removal of vitamin B_{12} and folic acid in the preparation of vitamin B_{15} concentrate.

2. Under the experimental condition reported above, the addition of vitamin B_{15} concentrate to all-vegetable ration resulted in a significant stimulation of chick growth. An increase in feed efficiency has always been found in supplemented group compared with unsupplemented control.

The study was supported in part by grants from Research Fund of the Ministry of Education, and from the Yoshitomi Pharmaceutical Co. Thanks are due to Dr. P. Handler of Duke University, N.C., U.S.A., for the generous gift of crystalline B_{12}.

References

1) Ott, W.H., Rickes, E.L., and Wood, T.R.: J. Biol. Chem., **174**, 1047 (1949).

2) Combs, G.F. et al.: J. Biol. Chem., **182**, 727 (1950). Sunde, M.L. et al.: Poultry Sci., **29**, 204 (1950).

3) Tomiyama, T. and Yone, Y.: The paper was presented to the meeting of the Japanese Society of Agricultural Chemistry at Kumamoto in Oct., 1950.

4) Yone, Y. and Tomiyama, T.: Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **18**, 658 (1953).

5) Tomiyama, T. and Sugihara, T.: Science Bull. Fac. Agric. Kyushu Univ., **13**, 297 (1951).

6) Broquist, H.P. et al.: J. Nutrition, **47**, 93 (1952). Sauberlich, H.E.: J. Biol. Chem., **184**, 337 (1952).

TERUHISA KATAYAMA AND TETUO TOMIYAMA

THE CHANGE IN ASCORBIC ACID CONTENT OF *PORPHYRA TENERA* DUE TO ECOLOGICAL AND PROCESSING CONDITIONS

Reprinted from the Journal of the Faculty of Agriculture,
Kyūsyū University, Vol. 9, No. 3, January 31, 1950

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 3
January 31, 1950

THE CHANGE IN ASCORBIC ACID CONTENT OF *PORPHYRA TENERA* DUE TO ECOLOGICAL AND PROCESSING CONDITIONS

Teruhisa Katayama and Tetuo Tomiyama

The divergent values have been reported so far for ascorbic acid of dried product of *Porphyra tenera* K., e.g., 664–821 mg per cent (Oya and Hirozawa) (1), 243 mg per cent (Fujita and Ebihara) (2), and 10–15 mg per cent (Nitta et al) (3). In order to make the cause of these variations clear, a study has been made on the variations in ascorbic acid content of fresh *Porphyra*, on one hand, due to the differences in growth and environment and of dried product, on the other, due to the difference in procedure for drying or storage.

The present work has clearly shown that the variation in ascorbic acid content of dried *Porphyra* is not due to the inconsistent content of ascorbic acid in fresh material itself but mostly due to procedures for storage of dried *Porphyra*.

I. The Method for Determination of Ascorbic Acid

The samples were taken from bamboo-collectors around the estuary of Tatara river in the vicinity of Fukuoka city. The alga was blotted free of excess water with filter paper immediately before the determination. The ascorbic acid was determined upon extracts of *Porphyra* using Okuda and Katai's method (4) with a modification of Mitsuda's procedure (5) for removing an inherent reddish color. The determination has been carried out as follows. To an appropriate amount of the sample (2–3 g) add twice its amount of cold ten per cent metaphosphric acid together with a small amount of silicic sand. After grinding it in a mortor, dilute

it tenfold with cold water, and leave stand for 30 min. in ice-cold water stirring frequently. After centrifuging the extract, add a small quantity of acid clay and then filter. Titrate the filtrate in the usual with a cold solution of 2,6-dichlorphenol indophenol.

II. The Variation in Ascorbic Acid Content due to Ecological Conditions

1. *The effect of growth rate and assimilation upon the content*

The determination has been made of ascorbic acid of *Porphyra* which had different sizes and was gathered in different season. The results are shown in Table 1. The ascorbic acid content was found always to be about 60–65 mg per cent and did not show any relation to the gathering season or the sizes of individuals.

Table 1. Change in ascorbic acid content with growth rate and assimilation.

Length of *Porphyra*			Date of gathering		Effect of assimilation	
					Collected	Irradiated
>15 mm	7–15 mm	<7 mm	10 Dec.	9 Jan.	at 9 a.m.	for 5 hours*
63.0	60.1	64.7	65.1	64.8	59.1	57.3

* exposed to sunlight from 9 a.m. to 2 p.m.

It has been reported that the content of ascorbic acid in spinach shows more or less diurnal variation (6). Experiments have been made, accordingly, to see the effect of assimilation on the change in the ascorbic acid content. Freshly collected *Porphyra* was placed in sea water in a glass dish and one part of it was exposed to solar radiation while the other was covered with a box. After five hours elapsed, both were analyzed for ascorbic acid. Data given in Table 1 show that ascorbic acid content does not change in appreciable amount with assimilation.

2. *The variation due to the change of conditions of environment for Porphyra*

Some experiments have been carried out to see extent of effects of various factors which may govern ascorbic acid content

of *Porphyra* while being alive in sea water or being preserved before drying.

The effect of pH was examined in the following way. Put a freshly collected *Porphyra* in sea waters having different pH's which were adjusted by adding varying amounts of hydrochloric acid. Leave them stand for 12 hours at temperature ranging from 8 to 13°C. and analyzed for ascorbic acid. The result is shown in Fig. 1. It will be seen that ascorbic acid of living *Porphyra* is fairly stable within a wide range of pH values of the medium, especially in alkaline region.

The effect of temperature has been observed by dipping a freshly collected alga in sea waters having salinity of 27.1‰ and temperatures ranging from 0 to 35°C. for 12 hours. Fig. 1 shows that ascorbic acid decreases with the rise in temperature. The extent of the decrease was not appreciable below 20°C.

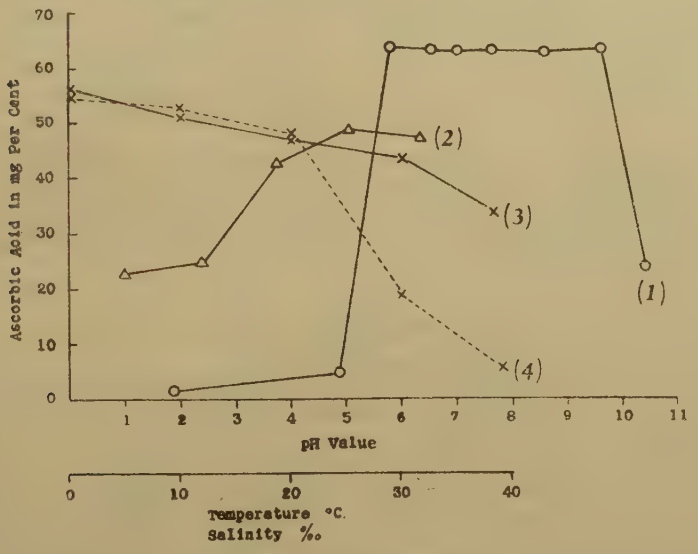


Fig. 1 Effects of several factors governing ascorbic acid content of living *Porphyra*. Curve 1 shows effect of pH; Curve 2, effect of salinity; Curve 3 and 4, effect of temperature for 3 hours and 12 hours, respectively.

The effect of salinity has been tested by leaving a freshly collected alga stand for 24 hours at temperatures ranging from 7 to 12°C. in sea water, salinity of which was adjusted to varying

values by diluting it with distilled water. It will be apparent from Fig. 1 that no decrease in ascorbic acid was observed above salinity of 18‰.

III. The Variation in Ascorbic Acid Content during the Manufacture of Dried *Porphyra*

1. *The effect of ascorbic acid oxidase upon the content*

It has been well known that the decrease in ascorbic acid on processing vegetables is generally influenced by the activity of ascorbic acid oxidase. By adopting the Iwata's procedure (7), a socalled stable form of ascorbic acid has been estimated, i.e., after grinding up 2 g of *Porphyra* with silicic sand, leave it stand for varying time-intervals, add metaphosphoric acid so as to make 2 per cent solution, and titrate the remaining ascorbic acid. It will be seen from Table 2 that the oxidase in *Porphyra* is not so active and the stable form of ascorbic acid is about 63 per cent. On examination of the figures given in Iwata's paper for the stable form of ascorbic acid in 141 samples of vegetables, it will be noticed that only 5 per cent of them contain the amount of the stable form which is comparable to that of *Porphyra*. Taking into consideration the stability and richness of ascorbic acid in *Porphyra*, it can be said that it is one of the important natural sources of ascorbic acid.

Table 2. Effect of oxidase upon ascorbic acid content of fresh and dried *Porphyra*.

Time in min. after maceration	Ascorbic acid of fresh *Porphyra*		Ascorbic acid of dried *Porphyra*		
	mg %	% remained	heated at 100° 30′ mg %	heated over heater mg %	Control mg %
0	63.3	100	290	290	284
5	39.2	62	259	266	208
10	40.0	63	231	258	198
15	41.5	65			
50	40.0	63			

Since it is a cold climate where *Porphyra* is gathered, the tissue may be frozen and the decrease in ascorbic acid will be

caused by the action of the oxidase. The decrease on keeping *Porphyra* for 5 hours at -10°C. has been observed as shown in Table 3. Because of the fact that the amount of the remaining ascorbic acid (76%) approximates to the so-called stable form of ascorbic acid (63%), a remarkable decrease in ascorbic acid may be most probably due to the ascorbic acid oxidase. When the frozen alga was dried, however, the remaining ascorbic acid was only 29 per cent. This may be accounted for by a simultaneous action of the oxidase and the auto-oxidation.

2. *The change of ascorbic acid with conditions for drying*

Several experiments have been carried out to see the extent of decrease in ascorbic acid content on drying *Porphyra*. It has been shown in Table 3 that when drying was carried out over a fairly long duration the decrease in ascorbic acid was remarkable, whereas only a slight decrease was observed on a quick drying no matter whether the drying was carried out by exposing to sunlight or by artificial heating.

Table 3. Effect of freezing and drying upon ascorbic acid content.

	Effect of freezing			Effect of drying		
	before freezing	after being frozen	after drying frozen sample	rapid air drying *	slow air drying **	dried in electric draft drier ***
Ascorbic acid mg %	51.1	39.5	14.9	292	141	320
Per cent destroyed		24	71	16	59	8

* dried at 14–20° for 2 h. 45 min. ** dried at slow rate by covering with a glass dish; 7 hrs. were required for complete drying. *** dried at 48–50° for 1 h. 40 min.

3. *The change of ascorbic acid during storage of dried Porphyra*

It may be presumed that the change of ascorbic acid during the storage will take place because of humidity and the ascorbic acid oxidase. In order to see the effect of humidity, a dried

Porphyra was put, on one hand, in a desiccator containing calcium chloride and, on the other, in a desiccator containing $Na_2SO_4 \cdot 7H_2O$ which shows a vapor tention of 13.2 mm Hg at 20°C. The change in ascorbic acid content was traced for about two weeks. To see the extent of the effect of ascorbic acid oxidase, a dried alga which was heated at 100°C. for 30 min. or directly over an electric heater was preserved in the same conditions as above.

As will be apparent from Fig. 2, the decrease in ascorbic acid of the dried *Porphyra* was very marked when kept in a

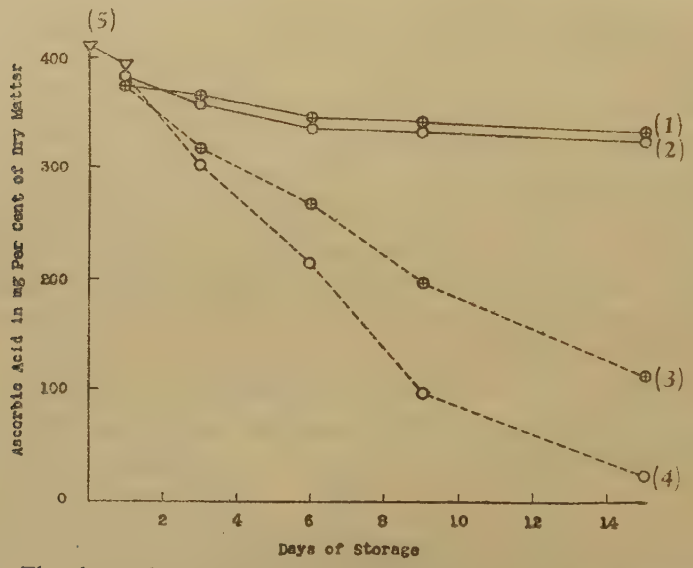


Fig. 2 The change in ascorbic acid content with time of storage depending on whether in dry or humid condition. Curue 1 and 2 show the change in a desiccator containing $CaCl_2$; Curve 3 and 4, the change in a desiccator containing $Na_2SO_4 \cdot 7H_2O$; Curve 1 and 3, experiment on *Porphyra* heated at 100° for 30 min.; Curve 5, the change in fresh *Porphyra* while preserving in water overnight.

humid chamber. The decrease in ascorbic acid content of an air dried *Porphyra* which had been heated at 100°C. was observed to be less than that of air dried *Porphyra* without any treatment. On the other hand, data presented in Table 2 clearly show that the ascorbic acid oxidase in air dried *Poryhyra* is as much active as in fresh one and heating at 100°C. for 30 min. destroys the oxidase to a certain degree. These evidences will indicate that

the change in ascorbic acid during preservation took place due to a combined action of humidity and the ascorbic acid oxidase.

IV. Summary

1. An appreciable change in ascorbic acid was not noticed during the growth of *Porphyra*.

2. The diurnal change in ascorbic acid was not appreciable.

3. A freshly collected *Porphyra*, when preserved in water having pH values of 5.8—9.8 and salinity values higher than 18‰ did not show the decrease in ascorbic acid content. When preserved at temperatures above 20°C., the content of ascorbic acid decreased somewhat after 3 hours, but decreased to a great extent after 12 hours.

4. The ascorbic acid content of *Porphyra* shows almost no change on being preserved in a dry atmosphere.

5. It has been pointed out that the extent of the decrease during the preservation in a humid atmosphere is enough to account for the discorcant values of ascorbic acid of dried *Porphyra*. Evidences have been presented that the change will most probably take place due to a combined action of humidity and the ascorbic acid oxidase.

The authors wish to express their hearty thanks to Mr. T. Yabuki and Miss S. Nakao for their assistance in carrying out some parts of the work. Thanks are also extended for a grant from the Research Fund of the Ministry of Education.

Laboratory of Chemistry of Fishery Product, Faculty of Agriculture, Kyushu University, August 1949

References

(1) Oya and Hirozawa: Jap. Soc. Scient. Fish., **5**, 195 (1936).
(2) Fujita and Ebihara: Tokyo Iji Shinshi, 2966, 237 (1936).
(3) Nitta, Taguchi and Mori: Jap. Soc. Scient. Fish., **13**, 153 (1948).
(4) Okuda and Katai: J. Agric. Chem. Soc. Japan, **15**, 80 (1939).
(5) Mitsuda: ibid., **14**, 1228 (1938).
(6) Sugawara: Jap. J. Botany, **11**, 343 (1941).
(7) Iwata *et al*: J. Agric. Chem. Soc. Japan, **18**, 673, 1058 (1942).

TERUHISA KATAYAMA AND TETUO TOMIYAMA

A STUDY ON A NEW ACIDIC COMPOUND ISOLATED FROM VOLATILE PORTION OF A GREEN ALGA, *ULVA PERTUOSA*

Reprinted from the Journal of the Faculty of Agriculture,
Kyūsyū University, Vol. 9, No. 3, January 31, 1950

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 3
January 31, 1950

A STUDY ON A NEW ACIDIC COMPOUND ISOLATED FROM VOLATILE PORTION OF A GREEN ALGA, *ULVA PERTUOSA*

Teruhisa Katayama and Tetuo Tomiyama

It has long been noticed that sea weeds on drying generally give off a particular odor just like so-called "isonoka" in Japan, which is smelled over every seashore. In the course of isolating this odorous ingredient from *Ulva pertuosa*, a compound of an acidic nature has been isolated. The analyses of its derivatives have shown that the compound has been hitherto unknown. The compound, accordingly, has been named as ulvaic acid.

The present paper deals with the method for isolation of reduced ulvaic acid and the determination of its molecular formula. The study of the constitution of ulvaic acid is under progress.

I. Method for Isolation of Ulvaic Acid

The procedures finally adopted for the isolation of ulvaic acid are as follows. The distillate which has been obtained by subjecting the dried *Ulva* to the steam distillation is extracted with ether. The ethereal layer is shaken with three per cent sodium hydroxide, washed with dilute hydrochloric acid and then with water. The ethereal layer contains a neutral compound having a specific odor. The alkaline aqueous solution having some weak odor is acidified with dilute hydrochloric acid and then extracted with ether. The ethereal extract containing ulvaic acid, on catalytic reduction with hydrogen and palladium black, yields some white crystalline matter. The yield of the reduced ulvaic acid was about 0.0002 per cent of dried *Ulva*. The fractional crystallization from ethanol gave two kinds of crystal which are named for the time being as

crystal X and Y. The yield of crystal Y was very small in most cases compared to that of crystal X.

II. Properties and Analysis of Crystal X

The crystal has no smell and shows a white leaf-shaped crystal form which usually combines forming a flower-like conglomerate (Fig. 1). It is insoluble in water, whereas easily soluble

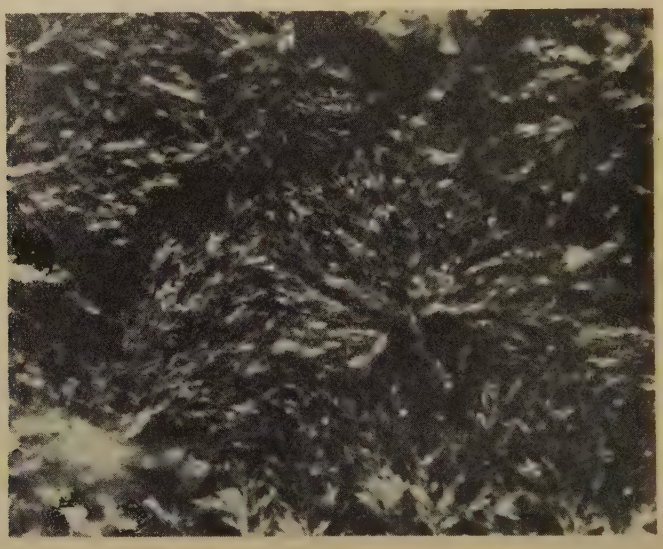


Fig. 1. Crystal X. × 90.

in ether, petroleum ether, 96% hot ethanol, pyridine, and dioxan, and slightly soluble in 96% cold ethanol or acetone. After several recrystallization from ethanol, it shows a constant melting point of 54.5–55.0°C. It dissolves readily in caustic alkaline solution. On adding to this solution a salt of silver, lead, copper, barium, calcium, or magnesium, a sparingly soluble salt in water precipitates.

The molecular weight was determined as shown in the following data to be about 290 by the Rast camphor method, by determining its acid radical, and by analyzing its barium salt.

1) The weights of sample and the camphor were 14.92 mg and 162.30 mg, respectively. The depression in the melting

point of camphor was observed to be 11.0°C. Hence the molecular weight can be calculated to be 306.

2) 12.07 cc of 0.0135 N alcoholic potash solution were required for the neutralization of 46.16 mg of the sample. The molecular weight was calculated to be 284.

8) 13.46 mg of barium salt yielded 3.92 mg of barium carbonate on incineration. The molecular weight was calculated to be 281.

Since the crystal does not contain water of crystallization, nitrogen, halogene, phosphorus and sulfur, an experimental formula of $C_6H_{12}O$ was obtained by the elementary analysis as will be seen in the following data.

Sample taken (mg)	found		calculated			atomic ratio		
	CO_2 (mg)	H_2O (mg)	C (%)	H (%)	O (%)	C	H	O
19.32	51.45	20.95	72.63	12.15	15.22	6.03	12.0	0.97
18.90	50.00	20.50	72.15	12.14	15.71			
calculated for $C_6H_{12}O$			71.93	12.08	15.99			

It follows, accordingly, that the molecular formula of crystal X is $C_{18}H_{36}O_3$. Because of the fact that the crystal yields salts of various metals, an acidic radical might be a carboxyl group. Determination of the form of one more oxygen in the molecule needs a further experiment.

III. Properties and Analysis of Crystal Y

Crystal Y is a white needle crystal (Fig. 2). The solubility in various solvents is qualitatively the same as crystal X. It is, however, less soluble in 96 per cent ethanol than crystal X. It melts at 64.5–65.0°C. The alkaline metal salt is soluble in water, but salts of heavy metal and alkaline earth metal are sparingly soluble.

The mixture of 7.53 mg of the sample and 84.43 mg of camphor shows the depression of 11.0° which corresponds to the molecular weight of 324. Since for neutralization of 9.01 mg of sample was required 1.76 cc of 0.0167 N alcoholic potash, the molecular

Fig. 2. Crystal Y. × 90.

weight should be 306. It will be presumed from this data that crystal Y may be an isomer of crystal X or a preexisting saturated compound similar to crystal X.

IV. Summary

1) A new acidic compound which is named as ulvaic acid has been isolated from steam distillate of *Ulva pertuosa.*

2) The molecular formula of the crystalline reduced ulvaic acid has been determined to be $C_{18}H_{36}O_3$.

3) Two modifications exist for the reduced ulvaic acid. One of them might be an isomer or a preexisting staturated compound similar to ulvaic acid.

In conclusion the authors wish to express their thanks to Mr. T. Kondo of the laboratory of wood chemistry for his aid in carrying out the elementary analysis. This study was carried out in part with the aid of a grant from the Research Fund of the Ministry of Education.

Laboratory of Chemistry of Fishery Product, Faculty of Agriculture, Kyushu University, August 1949

海藻の揮發成分に關する化學的研究 第1報
アナアオサ (Ulva pertusa K.) の揮發成分の分劃

片山輝久・富山哲夫
(九州大学農学部水産化学第一教室)

Chemical Studies on Volatile Constituents of Sea Weed
1. The Fractionation of the Volatile Constituents of *Ulva pertusa* K.

TERUHISA KATAYAMA and TETUO TOMIYAMA

No volatile compounds except methyl sulfide have been reported so far *Ulva pertusa* K. The following results have been obtained by fractionating various acidic and neutral compounds contained in the steam-distillate of a large quantity of air-dried Ulva.

1. After several preliminary trials, an appropriate method for the separation of volatile compounds in the steam-distillate has been devised and given in diagram 1.

2. The addition compound of methyl sulfide with bromine showing the same melting point as Haas reported, has been obtained from fraction (2) which does not condense at the steam distillation. At least two carbonyl compounds have been isolated as their respective hydrazones from fraction (2).

3. The existence of several carbonyl compounds have also been confirmed in an ethereal portion (fraction 6) recovered from an ethereal extract of the steam-distillate.

4. From a soap fraction (13), obtained after saponifying the ethereal extract freed from free acid with dilute potassium hydroxide, have been isolated palmitic acid and an odorous unsaturated compound which loses its odour on the catalytic hydrogenation using palladium black.

5. Due to a small yield of free acids soluble in the saturated solution of sodium bicarbonate (fraction 7), only an acid yielding p-bromphenacyl ester having m. p. 124-50°C. has been obtained so far.

6. The fraction of neutral compounds (14) gave on fractional distillation two fractions, one yielding 2, 4-dinitrophenyl hydrazone having m. p. 128°C. and the other, an a bromide showing a gradual decomposition between 174° and 190°C.

海藻の揮発成分については, HEILBRON 氏, 高岡, 安藤両氏, 白浜氏等, HAAS 氏, 小幡. 五十嵐両氏等の研究があるに過ぎない。HEILBRON 氏[1]はヒバマタの一種 (*Fucus vesiculosus*) の不鹸化物を研究して, テルペン化合物の存在を推定し, 高岡. 安藤両氏[2] は忍路産エゾヤハズ (*Dictyoteris devaricata* OKAM.) を水蒸気蒸溜して得た中性油中に, テルペン類の存在を指摘している。また揮発

(昭和25年9月7日受理)

性脂肪酸については，白浜．高橋．多勢三氏[3]はエゾイシゲ（*Pelvetia wrightii* YENDO）のエーテル抽出物を鹸化し，DYER 氏の反応によつて検索した結果，Caprylic acid, Caproic acid が僅かに陽性であつたと報告している。香気成分としては，HAAS 氏[4]は *Polysiphonia fastigiata* が Methyl sulfide を発散することを見出し，更にこの海藻を熱水処理すると発生しないことをも報告してゐる。最近，小幡．五十嵐両氏[5]もまたアオサを用いて追試し Methyl sulfide を分離し，なおこれは特殊な細菌の作用により生成することを確認している。

かように海藻の揮発成分に関する研究は比較的少く，しかも断片的である。この方面の系統的研究は“磯の香”の究明に，また水産食品の香気解明などに寄与するところが多いと考え，本研究に着手した。海藻としては新鮮なアオサが研究室の近傍（博多湾）で多量入手しやすいので，その天日乾燥したものを用いて，数種の揮発成分の分別について研究を開始した。先づ水蒸気蒸溜区分について二三分離法を予備試験した結果，やゝ満足すべき分劃方法が決定できたので，次にその大要を報告する。

實 驗 の 部

I 揮發成分の分離裝置並に方法

揮発成分は微量であるから，大量のアオサを水蒸気処理する必要がある。依てコツホの殺菌釜を利用して，Fig. 1 に示すような装置を組立て，ボイラーよりの蒸気を通じて蒸溜した。A は乾燥アオサ 5 Kg. を収容しうる蒸溜罐（コツホ釜）であり，a より生蒸気を吹込む。B 及び D は蒸溜液の受器である。E は冷却器 b 及び d にて凝縮しきれないで散逸する揮発成分を捕集するための洗滌瓶であつて，蒸溜中は絶えず水流ポンプにて弱く吸引する。e は E に水分が入るのを避けるための塩化カルシウム管である。乾燥アオサ 5 Kg. の蒸溜には予備試験の結果，蒸溜を約 4 時間経続し，溜出液約 5 l. を集めれば充分である。

第 1 図

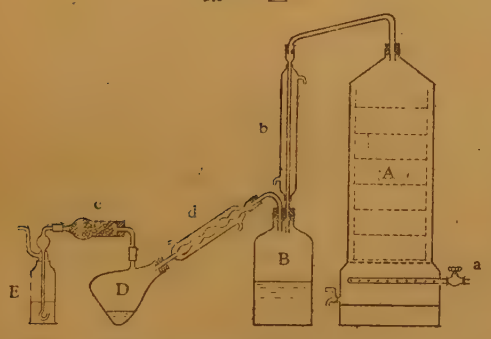
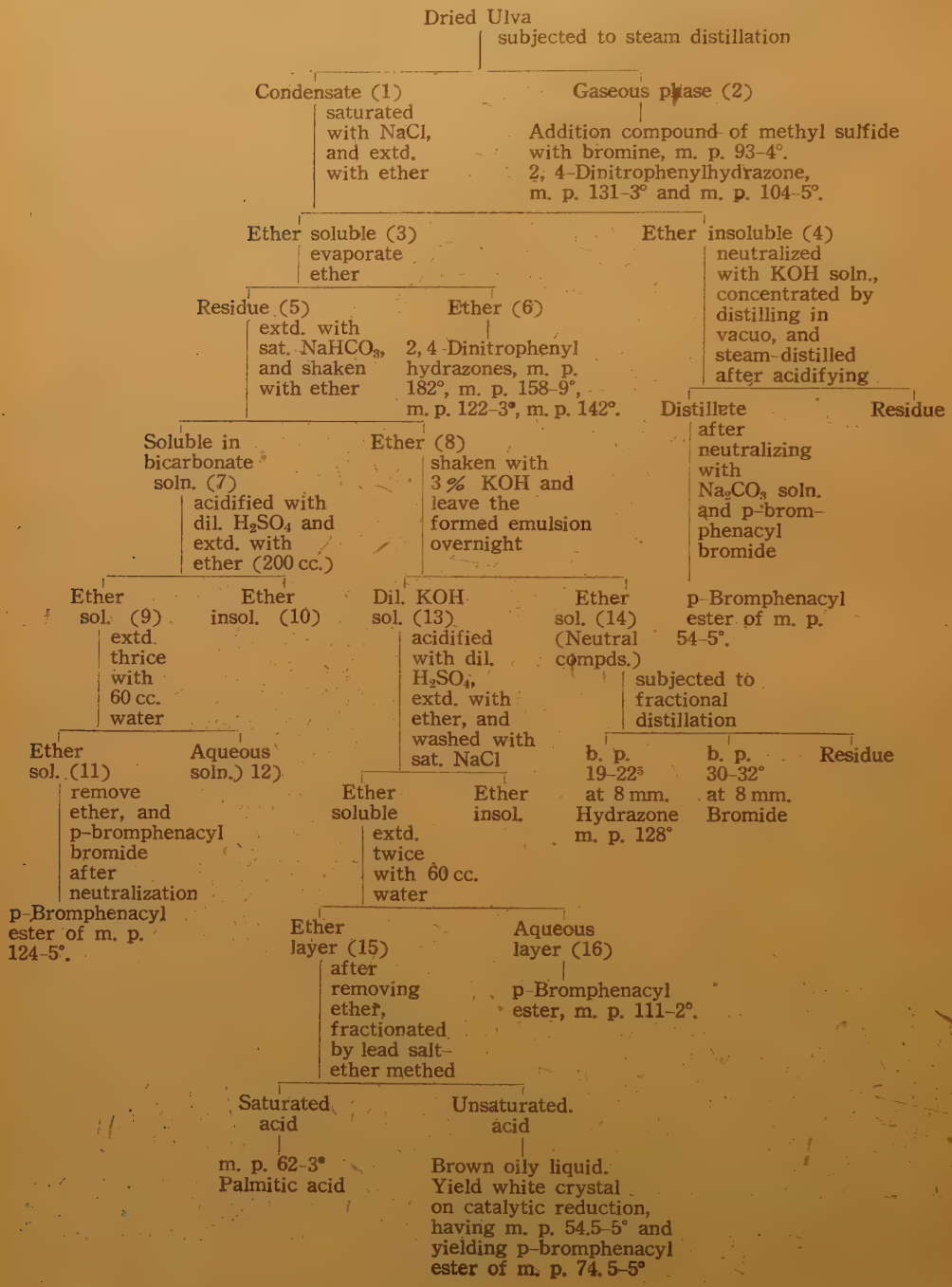


Fig. 1 An Arrangement of Apparatus for Steam Distillation of *Ulva*

揮発成分の分劃法としては，数回の分別実験の結果，1）溜出部分には凝縮し難い成分があること，2）溜出液を中和して減圧濃縮し，しかる後に酸性としエーテル抽出すると，不飽和酸区が殆ど得られなかつたので，この酸はエステル型であつて減圧濃縮中に失われたと思われる等のことが判つたので，Diagram 1 に示したような方法を採用した。即ち水蒸気溜出液を採取する場合に，凝縮し易い水溶区（1）と凝縮し難い気相区（2）とに分ち，気相の成分は二三の吸収剤によつて捕集した。凝縮区は食塩を飽和した後にエーテル可溶部（3）と難溶部（4）とに分別した。エーテル可溶部は注意して常圧でエーテル（6）を回収し，残渣（5）は飽和重炭酸ソーダ液及びエーテルと振盪して遊離酸区（7）とエーテル可溶部（8）とに分けた。エーテル可溶部（8）は更に 3 % 苛性カリで二回充分に振盪してエステルを鹸化し，鹸化部（13）を中性物質を含むエーテル層（14）と分離した。アルカリ溶液は酸性としてエーテルで抽出し，エーテルと水との分配率の差により更に分別し，水に可溶部（16）を除いたエーテル可溶部（15）は鉛塩エーテル法によつて，飽和酸と不飽和酸とに分別した。

Diagram 1. General Scheme for Separation of Volatile Constituents



II 各分劃區より揮發成分の分離

1. 蒸溜気相（2）よりの分離

a. Methyl sulfide の単離

Fig. 1 の装置で水蒸気蒸溜するに当つて，e 部に塩化カルシウム管をおき，E に臭素の四塩化炭素溶液を入れて，揮発成分を含む気相を通過させると，Methyl sulfide の臭素附加化合物が得られた。これを四塩化炭素より再結すると，HAAS 氏の得たと同一融点 93-4°C. のものが得られた。また E に昇汞の飽和溶液をいれて同様に捕集すると，白色の附加化合物をつくり，水洗後の乾燥結晶は 151—2°C の m. p. を示し，PHILLIPS 氏[6] のえた Methyl sulfide の附加化合物の m. p. 150—1° に近い。この結晶の少量をとり蒸溜水 10cc. を加へ，硫化水素を通じて飽和するとき，黒色の硫化水銀の沈澱を得た。これに醋酸ソーダ少量を加へて，中和し一夜放置後再び醋酸ソーダを加へて中和後，グラスフイルターにて濾過し，水洗後硫化物を秤量した。分析結果は次の如くであつて，Methyl sulfide の存在が確認された。

試料（g.）	硫化水銀（g.）	試料中の水銀量（%）	$3\,HgCl_2 \cdot 2\,(CH_3)_2S$ の水銀の理論値（%）
1.5943	1.1942	64.41	64.63

b. カーボニル化合物の分離

洗滌瓶 E に 2,4-Dinitrophenylhydrazine のアルコール・硫酸溶液[7] をいれて凝縮しない気相を通過させると，多量の hydrazone が得られた。hydrazone はベンゼン可溶のものを集め，WHITE 氏[8] 及び STRAIN 氏[9] のクロマトグラフ法を参考として分離した。即ち活性アルミナの一部を二時間灼熱して径 1.5 cm., 長さ 20 cm. のガラス管の下部に充塡し，上部は灼熱しない活性アルミナを充す。この両者の割合は，ベンゼンで溶出した時に上部に吸着せられた hydrazone が，灼熱したアルミナに達しない間に，下部の灼熱したアルミナに吸着された hydrazone が溶出されてしまうように加減した。かように，予めアルミナに吸着され易い hydrazone と吸着され難い hydrazone とを分離し，これを別々に灼熱しない活性アルミナで吸着，ベンゼンで展開し，各層を切断し，メタノールで溶出して結晶を折出させた。かくすると，m. p. 104-5°C. と m. p. 131-3° の針状結晶が得られたが，これらの同定は元素分析に付して後報で報告する。

2. 凝縮区（1）よりの分離

A. エーテル難溶部（4）より酸性物質の分離

エーテル難溶部は稀苛性カリ液で中和し，これを減圧濃縮後，稀硫酸で酸性として水蒸気蒸溜した。溜出液は酸性を示すので，稀炭酸ソーダ液で中和し，JUDEFIND, REID 両氏法[10] によつて p-bromphenacylester とした。m. p. 54-5°C. の結晶がえられ，これは methylethyl acetic acid のそれに相当するが，更に吟味を後報に譲る。

B. エーテル可溶部（3）よりカーボニル化合物及び酸性物質の分離

a. エーテル可溶カーボニル化合物の分離

エーテル可溶区（3）よりエーテルを溜去する際に，海藻の特殊な香りがエーテルと共に移行するので，予めエーテルの受器中に 2, 4-Dinitrophenyl hydrazine をいれておいて，この受器中にエーテルを徐々に蒸溜した。溜出エーテルは hydrazine とよく混和してから，エーテル及び過剰の hydrazine を除く。残渣に 96% エタノールと濃硫酸とを加える BRADY 法[7] によつては結晶状に導き得なかつたが，濃硫酸の代りに濃塩酸を加える ALLEN 法[11] によると，結晶性 hydrazone が得られた。これを前記（1. b 項）のクロマトグラフ法で分別したところ，最も吸着され難いものからは m. p. 182°C. の赤黄色針状結晶及び m. p. 158-9°C. の赤色針状結晶を，比較的吸着され易いものからは m. p. 142°C. の

赤黄色針状結晶及び m. p. 122-3°C. の黄色針状結晶が得られた。これらの m. p. に相当する化合物を，hydrazone の収量の多い順に列挙すると次の通りである。

2, 4-Dinitrophenyl hydrazone の m. p.	アルコールに於ける溶解度	m. p. に相当する化合物
182°	最も難溶	Isobutyraldehyde
158-9°	やゝ可溶	——
122-3°	最も易溶	Isovaleraldehyde
142°	可溶	α-β-Hexenal

これらの同定は元素分析の上，まとめて報告したい。

b. 飽和重炭酸ソーダ可溶区より酸性物質の分離

前項に記載したカーボニル化合物を除いた粗油は，100 Kg. 風乾アオサより約 15 g. あつた。これより遊離酸を除く目的で約 200 cc. のエーテルに溶解し，飽和重曹水約 50 cc. を加えて充分振盪して，可溶物を除き，更に同様の操作を繰返して，可及的に重曹水可溶物[7]を分取した。これを稀硫酸で酸性とし，食塩飽和後約 200 cc. のエーテルによつて可溶物を抽出する。エーテル可溶物は飽和食塩水で洗つた後，脱水し，エーテルを溜去すると，淡黄色の油状物質 1.5 g. を得た。これを水・エーテル間の分配率の差によつて，水溶性脂肪酸を分離しようと試みたが，材料僅少のため，確認するに至らなかつた。エーテル可溶の区分にはカーボニル化合物の存在は認められなかつた。次に p-bromphenacylester に誘導したところ，m. p. 124-5° の針状結晶を得た。この融点に相当する酸は文献には見当らないので，更に吟味中である。

c. 3% 苛性カリ可溶の酸性物質の分離

重曹可溶物を除いたエーテル層[8]に 3% 苛性カリ液を加えてよく振盪すると，エマルジョンをなすので，一夜透明となるのをまち分液し，更に同様の操作を繰返し，アルカリ可溶部[13]を分取した。これは稀硫酸にて酸性とし，エーテルにて抽出し，水・エーテル間の分配率の差により比較的水溶性酸区(16)を分別した。この p-bromphenacylester をつくると，m. p. 111-2°C の白色結晶を与えた。これは l-lactic acid に相当するが，決定は後報に譲る。

エーテル可溶部(15)よりエーテルを溜去すると，混合酸約 4 g. をえた。これを Varrentrapp の鉛塩エーテル法によつて飽和酸と不飽和酸とに分別した。飽和酸区は 94% エタノールより再結すると，大部分は m. p. 61-2°C. の鱗片状結晶よりなり，純粋なパルミチン酸と混融するも融点の降下を示さなかつた。更にこの結晶の中和価を測定すると，次のような値を示し，パルミチン酸の存在が確認された。収量は 100 Kg. 風乾アオサより 3 g. 得られた。

試料 26.06 mg., 0.0181N アルコール性苛性カリ消費量 5.18 cc., 中和価 210.2
パルミチン酸の中和価 218.6

不飽和酸区分は一種の香気ある黄褐色油状であつて，hydrazone をつくらないので，カーボニル化合物は存在しないと思われる。これを脱水して無水アルコールに溶し，パラヂウム黒を触媒として水素添加すると，香は消失し，白色結晶が得られた。その m. p. は再結を繰り返すも 54.5-5°C. で一定し，p-bromphenacylester をつくると，74.5-5°C. の白色結晶がえられ，文献にみられないので未知の酸と思われる。水添したものゝ収量は約 0.7 g. であつた。

d. 中性区分の分劃

粗油より重曹可溶区分及びアルカリ可溶区分を除いたエーテル層には中性油が含まれるので，よく水洗して脱水後エーテルを除くと，100 Kg. 風乾アオサより約 7 g. 得られた。分溜すると次のような区分が得られた。

分劃番号	b. p.	気圧	収量	色	香	Phloroglucin-塩酸反応	エーテル不溶 bromide
1	19–22°C.	8 mm.	3 g.	無色	強	−	−
2	30–32°C.	8 mm.	1 g.	黄	強	+	+

No. 1 は BRADY 氏法[7]により hydrazone をつくると，m. p. 128°C. のものを与えた。No. 2 は bromide をつくり，分解温度は 174–190°C. であつた。

総　　括

1. 多量の天日乾燥アナアオサを使用して，揮発成分を効果的に分離検索する方法を決定した。

2. 乾燥アナアオサの水蒸気蒸溜に当つて，凝縮し難い気相からは Methylsulphide の存在と，また 2,4-Dintrophenylhydrazon をつくるカーボニル化合物二種の存在を確認した。

3. エーテル可溶物中には，エーテルと共に溜出するカーボニル化合物四種の存在を確認した。

4. 苛性カリ可溶の酸区分よりは，パルミチン酸，及び不飽和の香強い液状酸性物質を得た。この不飽和酸を水添すると，香気は消失し，m. p. 54.5–5°C. の未知の白色結晶性化合物を与へる。

5. 重炭酸ソーダ可溶の酸性物質として，低級脂肪酸の存在が推定されるが，材料僅少のため同定出来なかつた。たゞ p-bromphenacyl ester として m. p. 124–5°C. のものを得たに過ぎない。

6. 中性区分については，m. p. 128°C. の hydrazone と分解温度 174–190°C. の臭化物を得た。

本研究の一部は文部省の科学研究費によつて遂行したことを附記し，謝意を表する。

文　　献

(1) HEILBRON, I.: J. Chem. Soc., 1572 (1934).
(2) 高岡，安藤：化学と工業，**2**, 6, 147 (1949).
(3) 白浜，高橋，多勢：日本化学会誌，**54**, 619 (1933).
(4) HAAS, P.: Biochem. J., **29**, 1297 (1935).
(5) 小幡，五十嵐：日本水産学会年会講演 1950年4月).
(6) PHILLIPS, F. C.: J. Amer. Chem. Soc., **23**, 250 (1901).
(7) BRADY, O. L.: J. Chem. Soc., 756 (193).
(8) WHITE, J. W.: Analyt. Chem., **90**, 726 (1948).
(9) STRAIN, H. H.: J. Amer. Chem. Soc., **57**, 758 (1935).
(10) JUDEFIND, W. L., and REID, E. E.: J. Amer. Chem. Soc., **42**, 1043 (1920).
(11) ALLEN, C. F. H.: J. Amer. Chem. Soc., **52**, 2955 (1930).

電氣漁網の研究（第II報）
——交流・兩波整流・半波整流の刺戟效果(1)——

黒木敏郎
（鹿児島大学 水産学部）

Studies on the Electric Fish-Screen (II)
—on the effects of stimuli by A.C., F.R.C. and H.R.C.—

TOSHIRO KUROKI

The second method to economize the electric power by which fishes shall be electrified or electrocuted is to be found in the studies on the forms of electric waves. To get the clue of the finding, the author compared the effects of stimuli by the three electric currents, or alternative current (A.C.) and full-wave rectifying current (F.R.C.) and half-wave rectifying current (H.R.C.).

The results got are as follows:——

a) To equilize the strength of of stimuli with A.C,. from 2 to 4 times electric power is needed in F.R.C., from ⅓ to ²/₃ electric power is needed in H.R.C..
These facts mean that in the effects of stimuli not only voltage (V) but also the change of voltage (dV/dt) is important.

b) In the stimuli by R.C., the reaction is more acute. When the anode is set at the head-side and the cathode at the tail-side, than the reverse case.
The difference between the sensibilities by those two settings is more remarkable in small fishes, but it becomes unperceived in large fishes.

c) In small fishes electrifying voltage are low; on the contrary, in big fishes electrocuting voltage are low. These facts suggest us any methods to keep larvae of fishes from the annihilating effects.

〔目 次〕

I. 序 II. 実験装置並に資料 III. 実験結果 IV. 結果に対する考察 V. 結び

I. 序

電力を直接海中に通じて漁法に活用しようとする場合先づ当面するのは使用電力縮減の問題である。筆者は前報(2) に於て周波数即ち刺戟リズムを適当に選ぶことによつて電力を節約しうることを論じた。本報では，電力節減の第二方途として電波形を考究するのに，そのいとぐちを得るため，交流刺戟と整流（直流）刺戟との效果の差を検討せんとするものである。

（昭和25年9月9日受理）

日本水産学会誌　第十六巻第十二号　昭和二十六年

魚類の鮮度測定法に関する研究　第1報
鰓のカタラーゼ作用力による魚類の鮮度測定

Studies on Method of Estimating Freshness of Fish
1. Estimation of Freshness by Determining the Catalase Activity of the Gill.

富山　哲夫・米　康夫・井出　克己

Tetsuo TOMIYAMA, Yasuo YONE and Katsumi IDE

（九州大学農学部水産化学教室）

The methods hither-to presented for estimating the freshness of fish-flesh have made use of either organoleptical, bacteriological, physical or chemical principle. Of these, the chemical method has been widely used because of its reliability[3]. Recently, certain simple and feasible chemical methods have been reported by Amano[1], and Mori[2]. All of these methods naturally require certain amounts of flesh to be tesed. It will certainly by practical, however, if it is possible to estimate the freshness of the flesh by examining a certain part of fish other than the flesh. An attempt has, accordingly, been made to estimate the freshness of the flesh by determining the catalase activity of the gill. The results obtained can be summarized as follows.

1) Nearly no change in catalase activity of the gill has been observed during the progress of lowering in freshness of the fish when the homogenized gill has been used for the estimathion. This implies that the catalase activity of the bacteria which propagates on the gill, may by negligibly small.

2) A remarkable increase, however, in catalase activity with the increase in the volatile base of the flesh has been noticed when the gill has been used for the estimation without homogenizing it.

3) A preliminary experiment has been made of the estimation of the catalase acitvity by a manometric apparatus.

4) So far as the kinds of fish have been examined, an almost similar value in the catalase activity of the gill has been obtained at the time when the flesh contains 30mg of the volatile basic nitrogen per cent of the flesh.

I　緒　　言

魚体或は魚肉の鮮度測定法として従来提出された方法を大別すると，肉眼的方法，細菌計測法，物理的方法及び化学的方法がある。肉眼的方法は経験的に古くから用いられているが主観に左右される。細菌計測法は短期間に実施し難く，また物理的方法は不正確であつて，化学的方法のみが以上の方法よりも精度が高い化学的方法では魚肉の揮発性塩基，揮発性酸，非蛋白態窒素，アミノ態窒素，アンモニヤ，トリメチールアミン，硫化水素．インドール等のいづれかを測定して判定の指標としている。その他，還元力，チロシン反応，螢光現象，pH 等の測定も行われている。しかし之等の定量には化学分析の設備を要し，しかもその測定には熟練を要する。但し最近，天野．内山両氏[1] は Walkiewicz の昇汞沈澱法を吟味改良した簡易法を提出し，また森．秦両氏[2] は SH 基の還元力測定による簡易鮮度測定法を工夫している。之等の化学的方法ではいづれも魚肉について実験しているが，もし魚肉以外の部分を分析して魚肉の鮮度を推定することができれば，供試料の商品価値を害することがないので，極めて実用的方法を提出することができよう。

魚肉以外の部分では鰓が肉眼的判定の重要な位置を占めているのは周知の通りである。一般に魚体の鮮度

が低下すると鰓の褪色が認められるので，恐らく鰓のカタラーゼ作用力は減少するのではないかとの考えの下に，著者等は数種魚類の鰓のカタラーゼ作用力と魚肉の揮発性塩基との関係を吟味してみた。ところが予期に反し鮮度が低下しても，甚しく腐敗しない限りは，鰓全体のカタラーゼ作用力に増減はみられなかつたしかし鰓の表面に於けるカタラーゼ作用力を測定してみると，鮮度の低下と共に顕著にその作用力は増加することが認められた。たゞこの方法を実用化するに当つて，カタラーゼ測定法として残存過酸化水素を$KMnO_4$で滴定する方法は実験室以外の方法として不適当であるから，検圧法による鰓のカタラーゼ作用力の測定を予備的に試み，魚肉の揮発性塩基窒素との関係をみたところ，滴定法による場合と同様の結果が得られた。かように本法は間接的ではあるが，実用的な鮮度測定法として役立つことを知つたので，1950年4月の日本水産学会に概要を報告したが，茲にその詳細を以下報告する。

Ⅱ 実 験 方 法

A. $KMnO_4$滴定法によるカタラーゼ作用力の測定法

鰓を400mg切りとり，0.3%H_2O_2の100ccを加えて20°cに30分間放置し，その10ccに10%H_2SO_4の6ccを加えて反応を止め，0.1n $KMnO_4$で残余のH_2O_2量を滴定して分解されたH_2O_2量を求め，これを100ccに換算した値でカタラーゼ作用力を示した。反応時間を30分としたのは，時間的な分解経過を求めた結果，Table 2に示すように30分で稍々平衡に近づくからである。

なお鰓のとり方によつてカタラーゼ作用力が異りはしないかと考えられたので，マイワシを用いFig. 1に示す点線Lより切りとつた鰓葉と，点線M及びNより切り離して成るべく切り口を小さくするようにとつた鰓につき，そのカタラーゼ作用力を測定した結果，前者即ち切り口面積の広い鰓は84を示すに対し，後者即ち切り口面積の狭い鰓は43を示した。従て以下の実験では点線M及びNより切りとつた鰓を用いた。

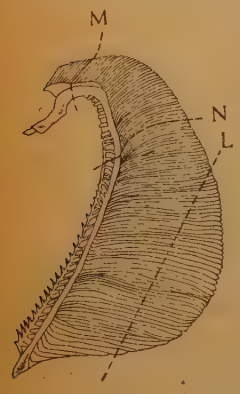


Fig. 1 Showing direction of cutting out a sample gill for the estimation of catalase activity.

B. 検圧法によるカタラーゼ作用力の測定

カタラーゼは過酸化水素を分解して酸素を発生するので，検圧計で発生酸素量を測定してカタラーゼ作用力を簡単に求めるよう工夫した測定装置はFig. 2に示すようなもので，広口瓶Aに鰓の400mgを入れ，3%H_2O_2の10cc を加えて直ちにコツクHを開いたまま蓋をし，コツクを閉じて発生する酸素量を検圧計で毎分測定した。実際的な場合を考慮すると，近似的なカタラーゼ作用値としては，3 分後の水銀検圧計の読みを採用して差支えないと考えられる。

C. 揮発性塩基窒素の定量法

鮮度の指標となる魚肉の揮発性塩基窒素の測定には，通気法[3]）と減圧法[3]）とが用いられている。しかしこの方法によると定量の完了には約2時間を要するし，また 10gの魚肉を必要とするので少量の試料で短時間に測定できる方法として著者の一人（富山）が考案した方法によつた。即ち5g の磨砕した魚肉を富山の考案した水蒸気蒸溜装置[4]）に入れ，次に酸化マグネシヤの懸濁液を加えてアルカリ性とし，水蒸気蒸溜すること 5～10分間（蒸溜液量約30cc）で揮発性塩基をn/14 H_2SO_4に吸収し，n/28 NaOHで逆滴定する。この方法の詳細な吟味は近く報告するが，二三の実験例を示すと，減圧法では19.7及び11.7mg%の肉は本法によると20.7及び12.9mg%を示した。本法は減圧法に比し 5～10%過大であるが，減圧法は 5%程度の低値を示す傾向にあるので，本法は必ずしも過大の誤差を与えるとは思われない。依て本研究に於ける魚肉の揮発性塩基量の定量には専ら本法を用いた。

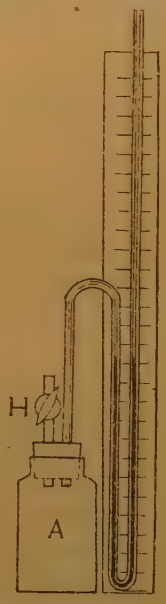


Fig. 2 Showing a manometric apparatus for the estimation of catalase activity of the gill. ¼ of Natural Size. A: Reaction Chamber. H: Stopcock.

Ⅲ 結 果 及 び 考 察

(1) $KMnO_4$滴定法によるカタラーゼ作用力と魚肉の鮮度との関係 23°c. の恒温

器に放置したカツオについて，一方鰓のカタラーゼ作用力をA項に示した方法によつて毎日測定し，他方肉の揮発性塩基を定量し，両者の関係をみた。その結果はTable 1に示すように，揮発性塩基の増加と共に鰓のカタラーゼ作用力は増加した。

Table 1 The Relation between Catalase Activity of Gill and Volatile Basic Nitrogen of Flesh of *Katsuwonus vagans* stored at 23°c

Days of storage	Volatile basic nitrogen mg%	Catalase activity ※
0	21	63
1	39	72
2	48	98

※ Expressed as cc of 0.1 n H_2O_2 decomposed by 400mg of gill.

Table 2 The Effect of Freshness upon Catalase Activity Measured on Intact Gill and on Homogenized Gill of *Katsuwonus vagans*.

Freshness of gill	Time of reaction in min.	Catalase activity※	
		Intact gill	Homogenized gill
Fresh gill	10	5	76
	30	5	105
	60	6	118
	90	8	120
	120	13	121
	150	15	121
Gill with low fresh-ness	10	90	90
	30	115	104
	60	132	113
	90	143	116
	120	148	120
	150	151	122

※ Expressed as cc 0.1 n H_2O_2 decomposed by 400mg gill.

※※ After storage at 23°c for 2 days. The flesh showed 43mg% volatile basic nitrogen.

鮮度の低下と共に鰓のカタラーゼ作用力が増加するのは，鰓全体のカタラーゼ作用力が増加するためか又は他の原因によるかを知るために，新鮮なカツオと腐敗したものの鰓を400mgづつ切りとり，磨砕したものと然らざるものとについてカタラーゼ作用力を測定した。その結果はTable 2に示すように，新鮮なカツオの鰓では磨砕したものは磨砕しないものに比しカタラーゼ作用力が著るしく大であつたが，鮮度の低下したカツオの鰓ではそのカタラーゼ作用力は磨砕したものも磨砕しないものも略々等しく，磨砕した新鮮な鰓のカタラーゼ作用力と大差はなかつた。この結果から考察すると，鮮度は低下しても鰓全体のカタラーゼ作用力は増減しないが，鰓の表面に於けるカタラーゼ作用力は鮮度の低下と共に増加することが明瞭である。また鰓全体のカタラーゼ作用力は鮮度の如何を問わず殆んど変化しないことは，鰓に増殖した細菌のもつカタラーゼ作用力は鰓のカタラーゼに比し無視しうる程度であることを裏書きしている。従て鰓の表面に於けるカタラーゼ作用力の増加は細菌カタラーゼによるのでなく，細菌によつて鰓表皮の溶解が進み，カタラーゼの多い鰓の毛細管組織が過酸化水素に触れるためと推察される。

以上の結果にもとづきマイワシ，ウルメイワシを23°cの恒溫器に放置し，A項に示した方法で10，30，60，90分後のカタラーゼ作用力を測定し，魚肉の揮発性塩基窒素との関係をみた。その結果はTable 3にみられるように，魚肉の揮発性塩基の増加と共に鰓のカタラーゼ作用力は増加する。なおカツオ，マイワシ，及びウルメイワシの反応時間30分に於ける鰓のカタラーゼ作用力と魚肉の揮発性塩基との関係を示すと，

Table 3 The Relation between Catalase Activity of the Gill and Volatile Basic Nitrogen of the Flesh of Fish Stored at 23°c

			Catalase Activity※		
Etrumeus micropus	Time of reaction of gill-catalase in min.	15	43	50	60
		30	55	72	89
		60	75	92	124
		90	88	—	133
	Volatile basic N in mg%	14	14	28	98
Sardinia melanosticta	Time of reaction of gill-catalase in min.	15	48	92	
		30	67	162	
		60	96	191	
		90	102	201	
	Volatile basic N in mg%		28	51	

※ Expressed as cc 0.1 n H_2O_2 decomposed by 400mg gill.

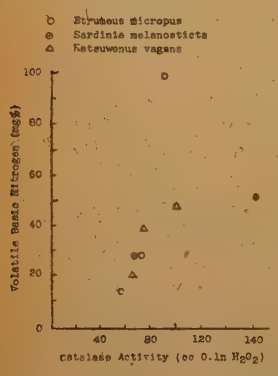


Fig. 3 The relation between catalase activty of the gill and volatile basic nitrogen of the flesh of *Etrumeus micropus*, *Sardinia melanosticta* and *Katsuwonus vagans*.

Fig. 3に示すように概ね直線的関係が見られる。

(2) 検圧法によるカタラーゼ作用力と魚肉の鮮度との関係

$KMnO_4$滴定法による鰯カタラーゼ作用力の測定値は鮮度測定の一指標として採用できることが判つたので，測定を更に簡単にする目的で検圧法を用いてみた。

クロダイ及びサバを23°cの恒溫器に放置し，毎日鰯のカタラーゼ作用力をB項に記載した方法で測定し，他方魚肉の揮発性塩基を測定し，Table4 に示すような結果をえた。即ち魚肉の揮発性塩基窒素の増加と共に鰯のカタラーゼ作用力は平行的に

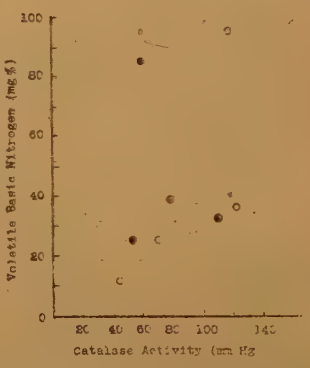


Fig. 4 The Relation between catalase activity of the gill and volatile basic nitrogen of the flesh of two kinds of fish; *Sparus swinhonis*, ○, and *Trachurus japonicus*, ●,

Table 4 The Relation between Catalase Activity of the Gill and Volatile Basic Nitrogen of the Flesh Stored at 23°c

			Catalase activity ※			
Sparus swinhonis	Time of reaction of gill-catalase in min.	1	19	—	60	55
		2	32	55	98	90
		3	45	71	124	120
		5	62	92	158	165
		7	71	108	186	190
		10	82	114	—	—
		15	90	115	—	—
	Volatile basic N. in mg%		11	25	36	95
	Time of storage in hrs.		0	25	32	49

Trachrus japonicus	Time of reaction of gill-catalase in min.	1	39	68	47	21
		2	48	96	67	46
		3	54	112	80	61
		5	—	132	95	77
		7	—	140	103	84
		10	—	—	107	—
	Volatile basic N. in mg%		25	32	39	85
	Time of storage in hrs.		0	23	28	45

※ Expressed as mm of the mercury manometer.

増加することが再確認された。 また反応時間 3 分に於ける鰓のカタラーゼ作用力と揮発性塩基との関係を Fig. 4に示した。魚肉の揮発性塩基窒素量 30mg%のときクロダイ，サバのいづれも水銀柱の読みは 97mmで一定している。但しサバは揮発性塩基窒素量 39mg%になると，鰓のカタラーゼ作用力が減少し，85mg%になると更に減少している。その原因については目下研究中であるが，腐敗初期の 30mg%前後にはカタラーゼ作用力が増加するので，鮮度測定には差支えないと考えられる。

Ⅵ 総　　括

1) $KMnO_4$滴定法により鰓全体のカタラーゼ作用力を測定した結果は，魚体の鮮度が低下しても増減しない。しかし鰓表面のカタラーゼ作用力は肉の揮発性塩基窒素の増減と常に正比例する。その原因について考察を行つた。

2) 検圧法により求めた鰓のカタラーゼ作用力と魚肉の揮発性塩基窒素との比例関係は，滴定法により鰓カタラーゼ作用力を定めた場合と全く同様の結果を示した。

3) 実験した魚種の範囲では，魚肉の揮発性塩基窒素量 30mg%のとき鰓のカタラーゼ作用力はほゞ近似値を示すようである。

本研究に佐々木林治郎教授を主任とする「食品の鮮度保持に関する研究」に対する科学試験研究費によつて支弁した。

文　　献

1. 天野慶之．内山均 ： 日本水産学会誌，14,48，(1948)
2. 森高次郎．秦満夫 ： 日本水産学会誌，15,407，(1949)
3. 衛生検査指針，[illegible]，26，(1950)
4. 富山哲夫．神崎嘉瑞夫 ： 日本水産学会誌，16巻11号に掲載予定

発性塩基窒素量が急激に増加するが，一方カタラーゼ作用力も肉の揮発性塩基窒素30mg%附近からは急激に増加するため，腐敗の初期を明確に知ることができる。またこの表に明かなように鰓のカタラーゼ作用力は反応時間の経過と共に増大し，新鮮な鰓では5分間で反応は殆んど平衡するが，鮮度が低下すれば7分以上経過しないと平衡に達しないから充分に平衡に達した時の値を以てカタラーゼ作用力を表わすべきであるしかし実用的な点を考慮すれば，3分後の反応量を以てカタラーゼ作用力を近似的に示すことも可能であるなおこの結果より魚肉の揮発性塩基窒素量と反応時間3分に於ける鰓のカタラーゼ作用力との関係を図示すると，Fig 2に明らかなように魚肉の揮発性塩基窒素量と鰓のカタラーゼ作用力は正比例し，腐敗の初期といわれる揮発性塩基窒素量30mg%のときのカタラーゼ作用力は反応時間3分で約45mmを示した。

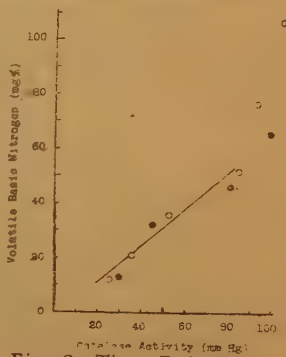


Fig. 2 The Relation between the catalase activity of the gill and the volatile basic nitrogen of the Fresh of *Cyprinus carpio* ○…… Observed value for one carp, ●……for the other carp.

結　　論

1）鮮度の低下と共にカタラーゼ作用力が増加する原因は，細菌の作用により鰓の組織が分解されるために，みかけの鰓のカタラーゼ作用力が増加したためと考えられる根拠を示した。

2）コイにつき魚肉の揮発性塩基窒素量と鰓のカタラーゼ作用力との関係につき実験した結果，肉の揮発性塩基窒素量の増加と鰓のカタラーゼ作用力の増加とは正比例し，揮発性塩基窒素 30mg% のときの鰓のカタラーゼ作用力は二尾のコイに於てほぼ近似値を示し，反応時間3分で水銀検圧計の約 45mm に相当するカタラーゼ作用力を示した。

本研究は佐々木林治郎教授を主任とする「食品の鮮度保持に関する研究」に対する科学試験研究費によつて支弁した。

文　　献

1．富山．米．井出：日本水産学会誌に印刷中

食品の鮮度測定法に関する研究　第 3 報
魚肉の揮發性鹽基の水蒸氣蒸溜による一新定量法 *

富山哲夫・井出克己・秋山　勉
(九州大学農学部水産化学第一教室)

Studies on the method for testing the spoilage of foods (III)
A new steam-distilling method for the determination of volatile base in fish flesh

Tetuo TOMIYAMA, Katsumi IDE and Tsutomu AKIYAMA

A new steam-distilling method has been presented for the determination of the volatile base-N in fish flesh. Data have been presented showing that the fish muscle brei on direct steam distillation at either pH 7.6 or 9.0 gave value of about 145 % of that obtained by the vacuum method, whereas a 1-3 % trichloracetic acid extract of the brei gave value of nearly the same as that by the vacuum method, irrespectively of the freshness of the sample used.

The procedure for the determination is as follows: To a 16-g. portion flesh brei are added 100cc. water intimately mixing. Then 50cc. of 7 % trichloracetic acid are gradually added with a constant stirring, followed by the filtration with a dry filter paper. The filtrate is subject to the steam distillation using the apparatus shown in Fig. 1. Firstly, 5 cc. of n/14 H_2SO_4 are taken in the distillate-receiving tube, E, Which is connected to the cooler, C, as shown in Fig. 1. Then, a 50-cc. portion of the filtrate is poured into the inner tube of the apparatus, D, and 10 cc. of 10 % potassium carbonate are added. Next, the steam is passed into the inner tube by way of the steam jacket. when the distillate amounts to 40cc., the receiving tube is disconnected. The sample remained in the inner tube of the apparatus, D, is drawn out into the outer jacket by clamping both c_2 and c_3. Through the receiving tube carbon dioxide-free air is passed for longer than three minutes. An excess acid remained is titrated with n/28 NaOH using methyl red as indicator. The mg.%-value for volatile base-N can be calculated by equation (1) or approximate equation (2). The above procedure enables us to reduce the time required for one determination to about one-fourth of that required for the vacuum-distilling procedure.

I　緒　　言

魚肉の鮮度の化学的判定法としては，トリメチールアミン及び揮発性酸の値が適切であると最近報告されているが[1]，揮発性塩基の定量値が鮮度の判定に極めて有力であることは既に多数の研究によつて確認されている。従て食品検査指針[2]にもこの定量が「水産食品の鮮度腐敗検査法」として採用されている。

しかしこの公定法，即ち通気法或は減圧法を実施しようとすれば，一回の定量に前者は $2^1/_2$ 時間，後者は $1^1/_2$ 時間を要するので，多数試料の定量には甚しく不便である。之等の方法による定量が長時間を要し

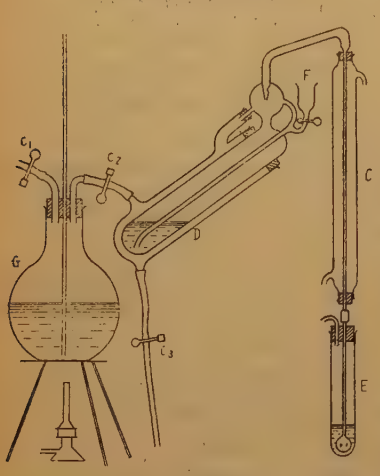
* 九州大学農学部水産化学教室並に水産実験所業績．本研究の概要は昭和 26 年 11 月 6 日福岡に於ける日本水産学会大会で報告した。昭和 26 年 11 月 22 日受理．(印刷費負担)

ている理由は，いずれも 45°C. 以上の蒸溜温度では揮発性塩基が新生するのを懸念して，この温度以下で操作するように注意しているためである。しかしもしこの揮発性塩基の二次的発生の原因となる物質が大きな含窒素分子であるとすると，除蛋白液について定量を行えば，45°C. 以上で操作しても誤差は余り大きくないであろう。

依て著者等は既に富山がミクロケルダールの蒸溜及び硫化水素の定量に応用してきた水蒸気蒸溜装置を使用し，先ず除蛋白しない場合の誤差の大きさを求め，次に除蛋白剤として三塩化醋酸を用いた場合について種々吟味してみた。その結果前記の推察が正しいことを確かめたので，水蒸気蒸溜操作の導入によつて定量時間を従来法の約 1/4 程度に短縮することに成功した。

Ⅱ 定 量 方 法

a) 水蒸気蒸溜装置：装置の配置は Fig. 1 に示す通りである。蒸溜器 D の部分については既に報告したが[3]，本定量には内管の径は約 5.5cm.，外管の径は約 8.0 cm. の大型のものが便利である。当研究室で従来用いてきた窒素蒸溜装置と比べると，冷却管の先端にガス吸収用散気管を連結し，これを図のように大型試験管（径 4 cm.）E に挿入する点が異つているのみである。



b) 試料の調製：供試肉 16.0g. を乳鉢に移し，適量の海砂を加えてよく擂砕し，蒸溜水 100cc. を少量づつ添加しつゝよく均一な懸濁液とする。次に 7 % 三塩化醋酸 50cc. を攪拌しつゝ混和した後，乾燥濾紙で濾過し，濾液 50cc. を水蒸気蒸溜にかける。

c) 蒸溜及び滴定：先ず蒸溜受器（大型試験管）E に n/14 硫酸 5cc をとり，ガス吸収用散気管を備えたゴム栓をし，散気管を冷却管 C の末端に連結しておく。前記の三塩化醋酸抽出濾液の 50cc. を漏斗 F を通じて蒸溜器に入れ，次に 10 %炭酸加里 10cc. を加える。他方，予めピンチコック C_2 及び C_3 を開いた後，水蒸気発生機 G のピンチコック C_1 を閉じて，水蒸気を蒸溜器 D の外管に通す。充分に外管が熱せられ，コック C_3 の外端から蒸気が出るようになれば，C_3 を閉じて蒸溜を開始する。供試液の種類によつては最初に発泡が著しい場合があるので，蒸溜の始めにはコック C_1 或は C_3 を調節して泡が冷却管に昇らないように注意する必要がある。水蒸気を通じて約5分間蒸溜し，溜出液が約 40cc. となれば，受器をはずし，之に約 1m. のソーダ石灰管を通した空気を 1 分間600～700cc. の速さで 3 分間以上通じる。かように炭酸ガスを除いた後，n/28 苛性ソーダでメチールレッドを指示薬として滴定し，揮発性塩基窒素量を (1) 式或は近似的には (2) 式により算出する。なお蒸溜を完了した蒸溜管の洗滌は次のように行う。コック C_1 を開き C_3 を閉じると，蒸溜外管の自然冷却により内管の液は外管に吸引されるので，次に C_2 を開き F より蒸溜水を適当量加え，再び C_2 を閉じて洗滌液を外管に吸引し，次に C_3 を開いて排出する。

$$(T-t)\times f\times 0.5\times\frac{150+16\,M}{50}\times\frac{100}{16}=\text{Volatile base-N in mg.\%} \quad \cdots\cdots(1)$$

Where, T ; titre of n/28 NaOH required for neutralization of 5cc. n/14 H_2SO_4 in blank experiment, t ; titre of n/28 NaOH required for back titration of remained acid after the distillation, f; the factor of n/28 NaOH M; the moisture content of the sample specimen in per cent. In case of flesh containing moisture ranging from 60 % to 90 %, the following simpli-

fied equation can be used within the error of 3%.

$$(T-t)\times f\times 10 \fallingdotseq \text{Volatile base-N mg. \%} \quad \cdots\cdots(2)$$

Ⅱ 実驗結果及び考察

1. 除蛋白せずに直接水蒸気蒸溜する場合の誤差

充分に擂砕したサバ肉 5g. を 20cc. の水に懸濁させ，フェノールフタレン数滴を加えて Fig.1 に示した蒸溜器に移し，酸化マグネシヤ懸濁液を赤色になる迄加えてから水蒸気を通じて蒸溜し，揮発性塩基の溜出速度を求めた。その結果は Table 1 の Exp. 1 にみられるように，減圧法値に比して水蒸気蒸溜値は常に過大であり，しかも蒸溜時間を延長すると少量宛の塩基性物質が溜出して一定値を示さなかつた。この操作の内で酸化マグネシヤ懸濁液を一定量添加することは困難であつたから，硫酸マグネシヤ 1g. と 5% NaHO 2cc. とを蒸溜管に加えて水酸化マグネシヤをつくり，その飽和状態で蒸溜することを試みた。その結果を酸化マグネシヤの場合と比較してみると，Table 1 の Exp. 2 及び 3 に示したように蒸溜量に於てもまた速度に於ても殆ど差がなかつた。

Table 1 The rate of steam distillation of the volatile base of muscle brei and of ammonia in the presence of muscle brei. Values given are the sum of values for distilled volatile base obtained at every 5-minutes intervals.

No. of expt.	Sample \ length of distillaton	5 minutes		10 minutes		15 minutes	
		n/28 NaOH cc.	as % of stand. value*	n/28 NaOH cc.	as % of stand. value*	n/28 NaOH cc.	as % of stand. value*
1	5g. mackerel flesh+20 cc. H_2O+MgO	4.13	137	4.28	143	4.43	147
2	5g. mackerel flesh+20cc. H_2O +1g.$MgSO_4$·7Aq.+2cc. 5%NaOH.	2.98	127	3.36	143	3.67	155
3	5g. whale flesh+40cc. H_2O+2g. $MgSO_4$·7Aq.+4cc.5%NaOH.	2.00	109	2.20	120	2.40	131
4	5g. mackerel flesh+20cc. H_2O +5cc. 5% Borax (pH 7.6).	2.40	105	3.06	134	3.35	147
	5g. mackerel flesh+20cc. H_2O +5cc 5% Borax+7 drops 8% NaOH (pH 9.0).	2.90	127	3.14	138	3.30	145
5	20cc. $(NH_4)_2SO_4$ (theor. 2.71cc. n/28).	2.73	101	2.73	101		
	20cc. $(NH_4)_2SO_4$+5g. mackerel flesh brei+1g. $MgSO_4$·7Aq+2cc. 8% NaOH.	5.98	Difference amounts to 103% of theor.	6.30	Difference 101% of theor.	6.52	Difference 102% of theor.
	20cc. H_2O+5g. mackerel flesh brei+1g. $MgSO_4$·7Aq.+2cc. 8% NaOH.	3.55		3.55		3.75	

* Standard value is that obtained by the standard vacuum-distilling method.

次に以上のような過大値を除く方法としては，アルカリ度を減じて蒸溜することが考えられる。依て硼酸緩衝液を魚肉粥に加えて pH 7.6 及び 9.0 に調節した後，蒸溜したところ，Table 1 の Exp. 4 に示すように蒸溜時間を長くすると少量づつ塩基性物質が溜出するので，過大値を除くことはできなかつた。

他方，硫酸アンモニヤ溶液を同様の条件で本装置によつて蒸溜した結果は，Table 1 の Exp. 5 に示したようにアンモニヤは 5 分間で溜出し，また魚肉粥の存在は蒸溜時間には全く影響がなかつた。従て蒸溜の延

長と共に徐々に溜出する塩基は蒸溜中に魚肉より新生するものであろう。

之等の実験ではいずれも蒸溜初期に発泡が著るしく蒸溜速度の吟味に困難があつたので，消泡剤としてエタノール，ブタノール，オクチールアルコール及び流動パラフィンを試みたが，流動パラフィン以外は效果がなかつた。流動パラフィンもアルカリ性で蒸溜すると，パラフィン自身が多少溜出し，滴定の終点を不鮮明にする欠点があつた。

以上の吟味から擂砕肉を直接に微アルカリ性で蒸溜する方法は，蒸溜中に発泡するので操作上からも困難なだけでなく，pH の調節に注意を払つてもなお過大値を与えるので，改良の余地のないことがわかる。

2. 三塩化醋酸による除蛋白濾液についての定量値

魚肉そのまゝを微アルカリ性で水蒸気蒸溜すると過大な結果を与えたが，100°C. で揮発性塩基を発生する物質がもし大きな分子であれば，除蛋白剤によつてこの誤差原因を除去しえられる筈である。依て公定法に従つて三塩化醋酸（TCA と略記する）で除蛋白した液 50cc. に 2g. の $MgSO_4 \cdot 7$ Aq. を混和して蒸溜管に加え，次に 10 % NaOH 5cc. を添加してから蒸溜してみた。しかしこの場合にはメチールレッドの変色点が極めて不鮮明であつた。依て試みに 2 % TCA 50cc. を同一条件で蒸溜したところ，メチールレッドの赤色から橙黄色迄の変化に n/28 NaOH の約 1cc. を要した。またこの蒸溜液にバリタ飽和液を加えると，著明な $BaCO_3$ の沈澱を生じた。之等の事実から TCA による除蛋白液の水蒸気溜出液の逆滴定終点が不鮮明なのは，明かに 100°C. に於て TCA が次式の反応に従つて分解するために発生した炭酸ガスに原因するものと思われる。

$$CCl_3COONa + H_2O \rightarrow NaHCO_3 + CHCl_3 \rightarrow CO_2$$

夫故に蒸溜液中に CO_2 を除いた空気を 1 分間 600cc. の速度で 2 分間以上通じた後，滴定を試みたところ極めて明瞭な滴定終点がえられた。かように蒸溜液より炭酸ガスを除く操作を採用すれば，必ずしも水酸化マグネシヤによりアルカリ性とする必要もないので，公定法と同様に 10 % K_2CO_3 10cc. を加えて蒸溜してもよい筈である。依てこの条件で揮発性塩基の蒸溜速度を吟味した結果は Table 2 に示す通りである。

Table 2 The rate of steam-distillation of the volatile base in trichloracetic acid extract of flesh. The number of cc. n/28 NaOH as multiplied by ten corresponds to mg. % of volatile base-N.

Sample used \ lenth of distillation		6 minutes		12 minutes		18 minutes	
		n/28 NaOH cc.	as % of standard value	n/28 NaOH cc.	as % of standard value	n/28 NaOH cc.	as % of standard value
Whale flesh	fresh *	1.90 §	103	1.95	105	1.95	105
		1.85	100	1.90	103	1.90	103
	spoiled *	6.51 §	102	6.61	103	6.61	103
		6.50	102	6.58	103	6.58	103
Scomber flesh		3.00 §	104	3.00	104	3.00	104
		2.95	102	2.95	102	3.00	104

* Stand procedure (Vacum-distilling 45°) gave 1.85 for the flesh and 6.38 for the Spoiled.

§ Prior to the distillation, 10cc. of 10% potassium oxalate were added together with 10 cc. of 10 % potassium carbonate.

この結果からみると，蒸溜は 6 分間（溜出量 40cc）. で完了し，減圧法値に比べると 2～4 % 程度の過大値を与えるようである。しかし試料調製や滴定の誤差を考慮に入れると，この過大値は無視しても差支えない

Table 3 Comparison between values for volatile base-N in trichloracetic acid extract, which were obtained by the present method and the vacuum-distilling method.

Kinds of sample	Vacuum-distilling method mg.%	Steam-distilling method mg.%	Kinds of chemicals used for alkalization
Horse-mackerel	17.3[1]	16.8	
	18.6[1]	19.7	
	19.5[1]	20.0	$Mg(OH)_2$
	18.5[2]	20.0	
Mackerel	21.4	23.2	$Mg(OH)_2$
		22.5	K_2CO_3
	36.0	36.2	$Mg(OH)_2$
		35.8	K_2CO_3
	29.5	30.4	
	55.9	55.1	
	157	159	
	223	228	
A[3]		83.7	K_2CO_3
B[4]		73.3	
C[5]		88.4	
Whale	18.5	19.0	
	63.8	65.0	

1) Sample flesh was passed through a fine gauze after being chopped.

2) Sample flesh was ground with silicic sand.

3) After suspending 20 g. muscle brei in 100 cc. water, 15cc. 20%. Trichloracetic acid (TCA) was added and then decanted. The residue was thoroughly extracted with 50cc. 2.5% TCA by twice centrifugations. The filtrate and centrifugate were combined and filled up to 250 cc. A 50-cc portion was used for the determination.

4) After being deproteinized by adding 15 cc. of 20% TCA, the mixture was decanted, and washed twice with 10 cc. 5% TCA. The filtrate was filled up to 250 cc. with water.

5) Determined according to the present new procedure described in this paper.

であろう。なお標準法のように蓚酸加里を加えることは蒸溜の値及び速度に全く影響がないことを知つた。

次に種々の試料の TCA 抽出液を $Mg(OH)_2$ 或は K_2CO_3 でアルカリ性とし，定量法の項で示した方法によつて定量した値を標準の減圧法値（45°, 60mm., 30分）と比較してみると Table 3 に示すようであつて，いずれの場合にも水蒸気蒸溜法値は比較的よく減圧法値と一致した。之等の結果から考えると，過大な揮発性塩基量を与える物質は 3% TCA で沈澱する程度の比較的分子量の大きな化合物であるとみなすことができる。こゝに興味多いことには，もし揮発性塩基の過大値の原因をなす高分子のものが鮮度の低下と共に低分子化するとすれば，TCA で沈澱し難くなり，その濾液は過大の値を示すべきであるのに，鮮度の如何を問わず減圧法値との一致がみられた。この点は鮮度の定量方法として好都合であるが，或は TCA の濃度によつて揮発性塩基の定量値に変動があるのではないかと考え吟味してみた。即ち腐敗サバ肉を用い除蛋白時の TCA の濃度を 1.1%, 1.6%, 2.2% 及び 3.2% に変化させた場合に，新法による値はそれ

ぞれ 91.2, 88.4, 89.1 及び 90.5mg.% と一定し，しかも減圧法値（86.5mg.%）に近似した。以上の吟味から TCA の濾液を用うれば高温蒸溜しても誤差を示さないことが明かになつた。

更に定量時間を短縮する目的で，TCA による抽出方法を定量法の項に示したように変改して，公定法に記載の除蛋白法と比較してみた。Table 3 に示したように簡易抽出法による値を 100 とすると，公定法の除蛋白操作によると 95 %，また公定法の場合に凝固蛋白の洗滌が不充分な例では 83 % に過ぎなかつた。公定法の操作では母液を凝固蛋白より完全に洗滌除去するには時間を浪費するので，本迅速法にはこの簡易抽出法を採用した。

Ⅳ 総　　括

1. 以下に記載する結果に基いて，水蒸気蒸溜法による魚肉の揮発性塩基の迅速な一新定量法を確立した。この方法によると標準法による定量時間の約 1/4 で定量できる。

2. 擂砕肉を除蛋白しないで直ちに pH 7.6, 9.0 或は $Mg(OH)_2$ 飽和のアルカリ性で水蒸気蒸溜するといづれの場合にも標準の減圧法に比して 145～159 % の過大値を与えた。魚肉に添加したアンモニヤは 5 分間で溜出するが　魚肉からは 5 分後にも徐々に塩基性物質が溜出した。

3. 三塩化醋酸で除蛋白した濾液に炭酸加里液或は $Mg(OH)_2$ を添加後，約 5 分間水蒸気蒸溜すれば鮮度の如何を問わず常に標準の減圧法の値に近似した値を示した。

4. 除蛋白操作を簡易化することにより，定量時間を大に短縮することができた。

終りに本研究に助力された原田悠三氏に深謝の意を表する。本研究の一部は昭和 26 年度文部省科学試験研究費（主任研究員　佐々木林治郎教授）により支弁したことを附記する。

文　　献

1. Sigurdsson, G.J. : Anal. Chem., **19**, 892 (1947).
2. 厚生省編纂：衛生検査指針 Ⅱ (1950).
3. 富山哲夫，神崎嘉瑞夫：本誌に印刷中.

食品の鮮度測定法に関する研究
第4報　揮発性塩基の高溫減圧蒸溜による迅速定量法

富山哲夫・原田悠三
（九州大学農学部水産化学第一教室）

日本水産學会誌
第十八巻　第三号　別刷
昭和二十七年九月二十五日発行

Reprinted from Sulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 18, No. 3, Aug, 1952

食品の鮮度測定法に関する研究
第 4 報 揮発性塩基の高温減圧蒸溜による迅速定量法*

富山哲夫・原田悠三
(九州大学農学部水産化学第一教室)

Studies on the Method for Testing the Spoilage of Food—Ⅳ.
A rapid Vacuum-Distilling Method for the Determination of Volatile Base

Tetuo Tomiyama and Yuzo Harada

The present paper deals with an improvement of the standard vacuum-distilling method for the determination of volatile base. Data presented here show that it takes only ten minutes to obtain the complete distillation of the volatile base under a certain reduced pressure over a higher range of temperature than 45°C.

A new procedure has been presented in which the distillation be carried out at 70°C. under pressure of 100 mm. Hg. Details of the procedure are as follows: Grind a 16-g portion of sample by mortar with an adequate amount of quartz sand, add 100 cc. water and then 50 cc. 7% trichloracetic acid, followed by the filtration with the dry filter paper. Pour 50 cc. of the filtrate and 10 cc. 10% potassium carbonate into flask, D, (Fig. 1) which is immersed in a water bath kept at 70°C. Evacuate to pressure of 100 mm. Hg by a suction and distill the volatile base into a large test tube, G (Fig. 1). After distilling for 10 minutes, titrate the acid remained, and calculate the result by equation (1) or (2) shown in the text.

Ⅰ 緒 言

富山，井出及び秋山[1]は三塩化醋酸による除蛋白濾液を微アルカリ性として 100°C. で水蒸気蒸溜すれば，溜出する揮発性塩基量は標準の減圧法値に比して 2～5% 程度の過大値を示すが，この方法によると約 10 分間で迅速定量しえられることを報告した。かように高温で操作しても僅少の誤差を与えるに過ぎないのであるから，従来の公定法に於ても 45°C. 以上の高温で操作した場合に，どの程度の誤差を招くかを吟味することは興味多い。従て本研究に於ては減圧法を 60° ～ 85°C. の水浴中で行つてみたところ，適当の減圧度であれば揮発性塩基は 10 分間で完全に溜出し，45°C., 70 mm. で 30 分間蒸溜の結果とよく一致することを確めた。依て定量に適当な温度—減圧度関係を吟味することによつて揮発性塩基の迅速定量法を決定することができた。以下その詳細を報告する。

Ⅱ 迅速高温減圧定量法

A 要する試薬類 (1) N/28 硫酸，(2) N/28 苛性ソーダ，(3) 10% 炭酸加里，(4) メチールレッド液:

1951 年 1 月 9 日受理 (印刷費負担)

* 九州大学農学部附属水産実験所業績。本研究の概要は昭和 26 年 11 月 6 日福岡に於ける日本水産学会大会で報告した。

0.1 g. メチールレッドを乳鉢に移し，11 cc. N/28 NaOH を加え攪拌溶解して後，蒸溜水を以て 100 cc. とする。(5) 7% 三塩化醋酸，(6) 海砂。

B 試料の調製 供試料 16.0 g. を乳鉢に入れ，適当量の海砂を加えてよく擂砕し，次に蒸溜水 100 cc. を少量づゝ添加しつゝ充分に均一な懸濁液とする。之に 7% 三塩化醋酸 50 cc. を攪拌しつゝよく混和した後，乾燥濾紙で濾過し，濾液 50 cc. を定量に供する。

C 減圧蒸溜装置 装置の配置は Fig. 1 に示した。従来の減圧装置と異る点は，定量終了後に蒸溜フラスコ D の内容物を吸引除去し更に加えた洗滌水をも除去する目的から，蒸溜フラスコの底部に達するガラス管 E を別に設け，之を外部の吸引濾瓶 B と接属するように改変したことである。これによつて蒸溜フランスコを毎回洗滌のために取はずすことなくまた毛細管を破損したりする懸念もなく，装置を湯浴内に固定したまゝ連続的に使用することができる。また蒸溜受器 G と吸引濾瓶 A との間に活栓 h_1 を挿入して，減圧より常圧に復する場合の逆流を防ぐように改変した。蒸溜受器 G に大型試験管を用いたのは，内容物を受器に入つたまゝ滴定するに便利なためである。

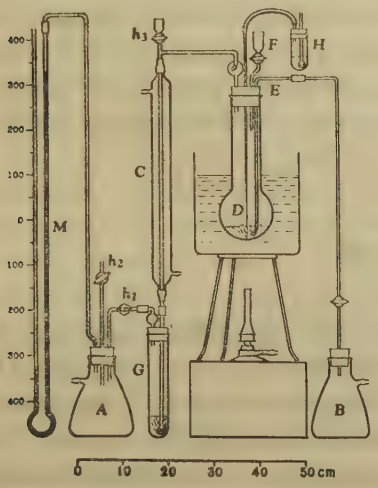


Fig. 1. Showing the arrangement of the distilling apparatus. A: vacuum reservoir, B: Pit for waste and washings, C: cooler, D: Distilling flask, E: tubing for drainage of residue after distillation, F: funnel, G: receiver of distillate, H: washer containing acid, M: manometer, h_1, h_2, h_3: stopcock.

D 減圧蒸溜 先ず蒸溜フラスコ D の入つた湯浴の温度を 70° ± 1°* に上昇させる。次に蒸溜受器 G に試料の濃度に応じて N/28 硫酸の 5～10 cc. をとり之に一滴のメチールレッドを加えた後，散気管を備えたゴム栓をし，次に散気管を冷却管 C の末端のゴム管に連絡する。他方，B 項でえられた供試液 50 cc. を漏斗 F を通して蒸溜フラスコ内に移し，更に 10% 炭酸加里の 10 cc. を添加する。蒸溜受器の一端を活栓 h_1 を通じて吸引濾瓶 A と連結し，水流ポンプを仂かし h_1 を開き，h_2 を調節して水銀柱 100 ± 10 mm.** の減圧とする。この程度の減圧であるから真空用マノメーターのない場合には，Fig. 1 に示したような自作した U 字型圧力計 M で充分に役立つ。この場合には圧力計を観察しながら，両水銀柱の上下差が約 660 mm. に達する迄とし，吸引濾瓶 A につけた活栓 h_2 の調節により減圧を一定とする。蒸溜が開始してから 10 分後に活栓 h_1 を閉じ，次に活栓 h_3 を徐々に開き，遂に常圧となつた時に蒸溜受器をとりはずす。他方，蒸溜フラスコ D 内の蒸溜残液は吸引濾瓶 B に吸引除去し，更に蒸溜水を D 内に加えて洗滌した液をも吸引除去すれば，装置は直ちに次回の定量にあてることができる。なお蒸溜の条件としては，前記の 70 °C., 100 mm.Hg の外に 60°, 60 ± 10 mm.Hg 或は 80°, 130 ± 20 mm.Hg の条件でも差支えない。

E 滴定 受器 G に残存する過剰の酸は，受器のゴム栓をとりはづすことなく半ば開いた位置に左手で支えたまゝ，N/28 NaOH で黄色となる迄滴定する。なお散気管の内部に硫酸が残つたりまた受器の上部に硫酸が飛散し附着する傾向があるので，滴定終点近くに散気管を液から上下したり，また内容液を受器の上部

* 70° より 75° に上昇するのは差支えないが，69° より低下するとフラスコの内容は充分に沸しないので低値を与える。

** 100 mm. 以下になることは差支えないが，110 mm. 以上の気圧となれば，結果が小さくなる危険がある。

迄廻転して洗滌した後，最後の変色点迄滴定せねばならない。滴定値から (1) 式によつて揮発性塩基量を求める。或は試料の水分が 60～90 % であれば，近似的に (2) 式によつて求められる。この場合には 5～10 cc. N/28 硫酸を用いて実施した盲検に於ける N/28 NaOH による滴定値 T を求めておけば，同量の硫酸を用いて供試料の蒸溜を行つた時の逆滴定値 t を T から控除した値の 10 倍が mg.% であるから，実験の進行中に直ちに試料中の揮発性塩基量を推定しえられる便がある。

$$(T-t)\times f\times 0.5\times\frac{150+16M}{50}\times\frac{100}{16}=\text{Volatile base-N mg.\%}\quad\cdots\cdots(1)$$

Where, T, titre of N/28 NaOH required for neutralization of 5～10 cc. N/14 H_2SO_4, t, titre N/28 NaOH required for back titration of remained acid after the distillation, f, the factor of N/28 NaOH, and M, the moisture content of the sample in per cent. In case of sample containing moisture ranging from 60 % to 90 %, the following simplified equation can be used within the error of 3 per cent.

$$(T-t)\times f\times 10=\text{Volatile base-N mg \%}\quad\cdots\cdots(2)$$

Ⅲ 実 験 結 果

1. 減圧法に於ける温度上昇の効果

湯浴温を 80°～85°，減圧を 60～70 mm.Hg として，クジラ肉の三塩化醋酸除蛋白液を用いて蒸溜を試みたところ，Table. 1 の Exp. 1 に示したように，標準の減圧法値に比してかなり過大な値を示した。この場合には蒸溜が急激であつて，充分に冷却されないので，受器に集る溜出液は激しく沸騰して酸の一部が損失したようにみえた。依て同一温度で減圧を 130 mm.Hg として 10 分間蒸溜してみた結果は，Table 1 の Exp. 2 に示したように標準の減圧法値とよく一致する値がえられた。この一致は試料の鮮度の如何を問わず常に認められた。次に湯浴の温度を 70°C，減圧を 65 mm. Hg として蒸溜してみた結果も標準法値とよく一致した。之等の条件に於ける蒸溜速度をみると，いずれも蒸溜開始後 5 分間で約 90 % が溜出し，10 分間で定量的な蒸溜の完了が明かに認められる。

またサバ肉或はカマボコの三塩化醋酸除蛋白液について 85°C., 130 mm Hg の条件で定量を行つた結果

Table 1. The rate of distillation of volatile base at 70～85° under varying low pressures from trichloracetic acid extracts.

No. of exp.	Kinds of sample	Temp. of bath (°C) and press. (mm.)	Amount of volatile base distilled at 5min.	10min.	15min.	Total volatile base-N N/28 NaOH	Average volatile base-N mg. %	Stand. value mg. %	Expressed as per cent of stand. value
1	Whale meat spoiled	85±1°	6.67	0.20	—	6.87	70.0	65.0	107.7
		65±5 mm.	6.61	0.24	—	6.85			
2		85±1°	6.32	0.05	0	6.37	65.1	65.0	100.1
		130±5 mm.	6.31	0.07	0	6.38			
3		70±1°	6.26	0.10	0	6.36	64.8	65.0	99.7
		65±5 mm.	6.25	0.09	0	6.34			
4	Ditto. fresh	85±1°	—	2.00	0	2.00	20.6	20.5	100.5
		130±5 mm.	1.96	0.08	0	2.04			
5	Mackerel flesh	85±1°	2.78	0.09	0	2 87	29.3	29.5	99.3
		130±5 mm.	2.80	0.06	0	2.86			
6	"Kama-boko"	85±1°	—	6.67	0	6.67	67.3	67.5	99.7
		130±5 mm.	—	1.43	0	1.43	14.4	14.2	101.4

も Table 1 の Exp. 5 及び 6 に示したように満足すべき値がえられた。

2. 高温減圧法に適当な温度及び減圧度の範囲

前項の実験によつて蒸溜浴温は少くとも 85°C. 迄上昇できることを知つたので，この改良法を仮に高温減圧法と呼ぶことにする。さて前記の一実験で蒸溜温度が高い場合に余り低圧にすると，溜出液が沸騰するために過大値を示すことが注意された。また逆に低圧が充分でなければ，蒸溜が不完全となること勿論であるから，定量に適当な温度—減圧度関係を求める必要がある。依て供試料としては 30°C. に一日放置したサバより採肉したものを三塩化醋酸で除蛋白した液について検討を行つた。

その結果は Table 2 に示す通りであり，また定量に適当な範囲は Fig. 2 によつて明瞭にみられる。即ち定量値が完全か不完全かの境界は図の直線で示され，これより高温，低圧の範囲ではみな 10 分間の蒸溜によつて標準法値と ±4% の範囲内で一致した値がえられる。しかし 80°C. 以上の高温となると多少過大値を示すようであるから，定量法の一最適条件として 70°C., 100 mm. を採用して定量法の項に示した方法を提出した。勿論，研究室でえられる減圧度や熱源の能率によつて 60°C., 60 mm. 或は 80°C., 130 mm. でも差支えないことは以上の実験結果から明かである。

他方，クジラの除蛋白液は 80°C. で 45 分間以上通気して揮発性塩基を定量しても過大値を与えないが，サバ肉の除蛋白液の場合には 45 分後も徐々に揮発性塩基の発生がみられ，一定値を示さないことを注意したので[2]，サバ肉を用いた本実験に於て蒸溜 10 分後にもなお揮発性塩基が発生するかを吟味してみた。その結果は Table 2 に示したように，吟味した範囲では塩基の溜出が全くみられない場合が多く，みられた場合でも 1~2% に過ぎなかつた。かように高温で蒸溜したにも拘らず 10 分以後の溜出が殆どなく，しかも 45°C., 70 mm. Hg で 30 分間の公定減圧蒸溜値と一致する理由は，蒸溜フラスコ内の供試液の実測温度

Table 2. The amount of volatile base-N of mackerel flesh expressed as per cent of the standard value, which distilled out under varying temperatures and pressures. All the values given are average of duplicate or triplicate determinations.

Temperature °C.	Pressure mm. Hg	Volatile base-N at 10 min. distilln.	Volatile base-N at 15 min. distilln.	Expressed as per cent of stand. value
45	65 ± 5	2.51 (30-min. distil.)		
55	50	2.51		100.0
60	50	2.51		100.0
60	80	2.49		99.3
60	95	1.86		74.1
65	70	2.55		101.5
65	100	2.46		98.0
65	110	2.28		90.8
65	140	1.88		74.9
70	90	2.62	0.00	104.2
70	100	2.49		99.3
70	130	2.45		97.6
70	140	2.34		93.2
75	110	2.61	0.00	103.9
75	115 ± 5	2.57	0.02	102.4
75	130	2.55	0.04	101.5
75	155	2.34		93.2
80	130	2.62	0.00	104.2
85	130	2.70	0.00	107.5

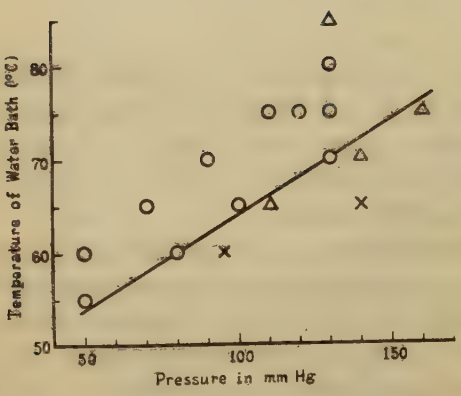


Fig 2. Showing the effect of temperature and low pressure upon complete distillation of volatile base. 96～104 %, ○; 91～95 % and 105～109 %, △; less than 90 %, ×.

が Table 3 に示すように湯浴温度より約 15°C. 位低いことと，蒸溜時間が短いので温度上昇による二次的な揮発性塩基の生成が僅少であつたためと考えられる。

本研究に於て供試した6個の異る試料の定量値及び同一試料についての 15 の定量値の全平均値は標準減圧法に対して 101.7 %，平均値より偏差の平均は 2.4 % であつた。この偏差は揮発塩基の含量によつても異るであろうが，滴定法としてはこれ以上精度をあげることは困難であろう。

Table 3. Temperature difference between inside and outside of the distilling flask.

Pressure mm. Hg	Temperature of		Difference
	water bath °C.	the flask content °C.	
140	80	64	16
110	70	56	16
100	70	53	17
65	60	45	15

Ⅳ 総　　括

1. 魚肉の三塩化醋酸抽出液の揮発性塩基を 70°C., 100 mm.Hg で蒸溜する迅速定量法を提案した。試料の調製から一回の定量完了迄に約 20 分で足りる。

2. 10 分間の減圧蒸溜で完全に定量しえられる温度—減圧度の条件を明かにした。

3. 本定量法をクジラ肉を用いて検討した結果は，標準の減圧法値を 100 とすると，6種の異る試料の 21 回の測定結果の平均値は 101.7，平均誤差は 2.4 % であつた。

本研究は主として厚生省の厚生科学研究費及び文部省の科学試験研究費（主任研究員 佐々木林治郎教授）により支弁したので，こゝに謝意を表する。またシロナガス鯨肉の試料を寄贈された日本水産株式会社戸畑支社に深謝する次第である。

文　　献

1) 富山哲夫，井出克巳，秋山勉：日本水産学会誌 17，191～196 (1952).

2) 富山哲夫，原田悠三：次報に報告の予定。

食品の鮮度測定法に関する研究　第5報
揮發性塩基の通氣定量法に関する研究*

富　山　哲　夫
(九州大学農学部水産化学第一教室)

Studies on the Method for Testing the Spoilage of Foods
V. A Study on the Aeration Method for the Determination of Volatile Base

Tetuo TOMIYAMA

A preliminary experiment has shown that lower values for the volatile base have often been obtained according to the official aeration procedre. This paper deals with a study of factors governing the rate of removal of volatile base by the aeration.

Only a little increase in the rate of removal of the base has been made by completely dipping the aeration tube into water bath and changing the dimensions of the aeration tube and drop catcher. It has been observed that this rate decreases with lowering in the freshness of the sample. A considerable increase in this rate, however, has been made by increasing the amount of potassium carbonate which is to be added prior to the aeration. The rise in temperature also remarkably reduced length of time needed for the complete determination. It is of interest that by raising temperature for the aeration, mackerel flesh gave an excess amount of base while whale meat did not give any excess amount even at 80 °C. The substance which gives rise to this excess base is now under study.

I　緒　　言

さきに著者[1]は揮発性塩基を 100°C. で 5 分間の蒸溜によつて定量する一新法を提出し，また著者[2]は減圧定量法を 70°C. で実施することによつて定量時間を著るしく短縮できる一新改良法について報告した．かように高温で蒸溜定量したにも関らず正しい揮発性塩基の値を示したのであるから，通気法に於ても 45°C 以上で実施すれば定量時間を大に短縮できる可能性がある。依て本研究に於ては塩基の駆逐速度に対する通気温度の影響を吟味してみた。

また著者[3]は食品衛生検査指針に記載の通気法による値は減圧法値よりも低いことを屢々経験し，硫酸アンモニヤ溶液では 82 %，魚肉では 75 % にしか達しないことを予報した。然るに本研究の終了後に最近，河端氏[4]は通気法に対する通気量及び温度の影響を詳細に吟味した結果，食品衛生検査指針に記載の原法で差支えないこと，また温度については 45 °C. 以上で実施すると過大値を示すことを報告した．夫故に本研究に於ては河端氏の研究結果との不一致の原因についても検討を行つた。

II　実験結果及び考察

* 昭和 27 年 2 月 19 日受理．九州大学農学部水産実験所業績（印刷費負担）

1. 通気温度 45 °C. の場合に於ける通気法の誤差

標準の通気法[5]によつて定量した揮発性塩基の値は Table 1, Exp. 1 に示すように，同一除蛋白液について求めた減圧法値に比べて約82～86 % にしか達しなかつた。また著者[1]が提案した試料の調製法によつてえた除蛋白液について定量を行つた通気法値は減圧法値の 64 % にしか過ぎなかつた。

Table 1. The effect of the dimensions of the apparatus and volume of potassium carbonate to be added upon the rate of removal of volatile base by passing 50 L air per hour.

No. of expt.	Vol. of 10 % K_2CO_3 added	Part immersed in water at 45°C.	Diameter of drop catcher in mm.	Time of aeration in min.	cc. n/28 H_2SO_4 neutralized by vol. base	Rate of removal expressed as percent of stand. value*
1	10 cc.	2/3	45	90	3.53	86.4
	10 cc.	2/3	45	90	7.90	81.5
	10 cc.	2/3	45	90	1.60	64.0
2	10 cc.	totally	28	90	1.75	70.0
				120	2.00	80.0
3	10 cc.	totally	28	120	2.15	86.0
				180	2.50	100
				240	2.60	104
4	20 cc.	totally	28	30	1.50	60.0
				90	2.30	92.0
				150	2.65	106
				180	2.70	108

* Standard value : value obtained by vacuum distilliug at 45 °C. and 60 mm. Hg for 30 minutes.

之等の数値は河端氏の結果と一致していない。この原因として考えられることは，第一に食品衛生検査指針に記載された通気法の装置は詳細を欠いているので，著者の用いた装置と河端氏の用いたものとが二三の点，例えば大型試験管や drop catcher の大きさ等の点で異つていたために，通気による駆逐が不完全に終つたとも推察され，また第二には大型試験管を湯浴に浸して加温する部分の多少によつても駆逐に難易がある可能性も考えられる。何となれば通気 90 分後に drop catcher の部に附着した液をネッスラー試薬で試験してみると，強いアンモニヤの呈色が認められたからである。依て著者の提案した方法[1]でえられたサバの三塩化醋酸除蛋白液を用いて吟味した結果は Table 1, Exp. 2 に示すように，drop catcher の球の直径を 45 mm より 28 mm とし，また球内の典管を除き，更に大型試験管の大さを直径 50 mm 長さ 300 mm より直径 40 mm 長さ 210 mm に縮少し，しかも大型試験管を湯浴中にその頸部迄浸して通気した結果も 64 % より 70 % へと僅かに良結果を示したに過ぎなかつた。

次に注目すべき点は著者の方法で除蛋白した材料が通気法によつては減圧法値の約 70 % にしか達しなかつた事実である。この場合の三塩化醋酸の濃度は約 2.0 % であつたが，食品衛生検査指針に記載の方法によると凝固蛋白部を洗滌する酸の量を規正していないので，実験者により異るであろうが，概ね 1.5 % 前後であろう。Table 1 に示した 86 % の結果をえた場合が酸の濃度 1.6 %，70 % の結果を示した場合が 2.0 % に相当したので，添加した 1 g の炭酸加里はそれぞれその 84 % 及び 67 % が重炭酸加里に変じた計算となる。依て同一魚肉を異る濃度の三塩化醋酸を用いて著者の方法で除蛋白したものにつき，標準条件で定量してみた。その結果は Table 2 に示したように，酸の濃度の大なる方が低い値を示した。また注目すべき点は減圧法値に対する通気法値の割合が試料の揮発性塩基量の多少によつて変動することである。即ち鮮度のよい試料では 90 分の通気による値は減圧法値に殆ど一致したが，鮮度の低下した試料では減圧法値より 10～15 % 低い値を示した。かように鮮度の低下と共に駆逐速度の低下を示す理由につき考えてみると，

Table 2. The effect of the freshness of the sample and the concentration of trichloracetic acid upon the rate of removal of volatile base by passing 50 L. per hour at 45°C.

Concn. of trichloracetic acid in sample %	Vol. base-N obtained by standard vacuum method mg %	60 min. mg. %	aeration % of stand. value	90 min. mg. %	Aeration % of stand. value	120 min. mg. %	Aeration % of stand. value
		(Volatile base-N expressed as)					
1.95	15.9	11.0	69.1	14.5	91.2	17.0	107
		10.7	67.3	14.5	91.2	17.1	107
				14.4	90.5	16.9	106
1.40	15.9	13.7	86.1	15.8	99.4	18.0	113
		12.8	80.5	15.8	99.4	18.0	113
				15.9	100	18.2	114
1.95	22.2	14.1	63.5	17.9	80.5	21.1	95.1
		13.9	62.5	17.7	80.0	20.2	91.0
				17.7	80.0	20.2	91.0
1.40	22.2	15.0	67.5	18.8	84.7	21.4	96.5
		16.1	72.5	18.9	85.2	21.0	94.5
				18.8	84.7	21.2	95.5

表の結果からの計算で明かなように，低いアルカリ度で 45°C のような低温度の下では，一定量の空気に拡散する塩基量は試料中の塩基の濃度に正比例しないためと推察される。

かように 45°C. の通気の場合には，試料中の三塩化醋酸の濃度や，また鮮度により駆逐速度が異るので，むしろアルカリ度を増した方が好ましいと考えられるに至つた．依て酸の濃度 2.0% の試料に対し炭酸加里の添加量を倍にしてみた。その結果は Table 1, Exp 4 に示すように，通気による駆逐速度が増大し，90 分の通気の値は 1 g の炭酸加里添加の場合に減圧法値の 70 % のものが 2 g 添加によつて 92 % に上昇した。

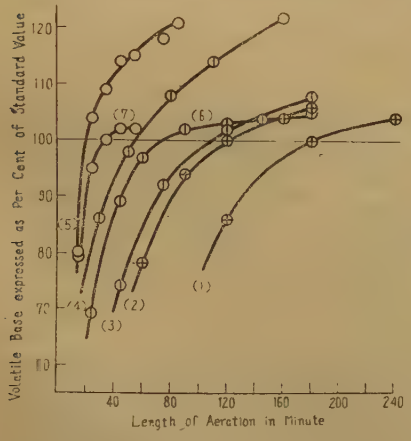


Fig. 1 The rate of removal of volatile base at varying temperatures and with varying amount of potassium carbonate by passing 50L.air per hour. Curve 1 shows mackerel flesh at 45° with 1 g.carbonate; curve 2, at 45° with 2 g.carbonate; curve 3, at 60° with 1 g. carbonate; curve 4, at 60° with 2 g. carbonate; curve 5, at 85° with 1 g. carbonate. Curve 6, whale meat at 60° with 2 g.carbonate: curve 7, at 85° with 1 g.carbonate.

以上のような吟味の結果から 45°C. に於ける通気によつて揮発性塩基を完全に駆逐する為には，除蛋白液の三塩化醋酸の濃度を一定とし，それに対して適当量の炭酸加里を用うべきことを明かにした。従て著者の方法によつて試料を調製する場合には，10% 炭酸加里 20 cc を添加し，通気時間は 120 分とすべきである．

2. 通気法値に対する温度の影響

通気温度が 45°C. の場合には，添加する炭酸加里の量により揮発性塩基の駆逐速度が著るしく異ることを明かにしたので，次に炭酸加里の添加量の異る場合に於て通気温度の上昇が駆逐速度にどの程度の効果を示すかを吟味してみた。その結果は Table 3 及び Fig. 1 に示す通りであつて，通気温度を上昇すると揮発性塩基の駆透速度は著るしく大となり，完全駆透に要する時間は 1 g 及び 2 g の炭酸加里添加の場合，45°C. ではそれぞれ 180 分及び 110 分を要するのに対し，60°C. ではそれぞれ 110 分及び 60 分，80°C. では 30 分に短縮された。またこの速度はクジラ肉についての結果か

Table 3. The effect of temperature and alkalinity on the rate of removal of volatile bese by passing 50 L. air per hour.

10 cc. of 10 % K_2CO_3 added						20 cc. of 10 % K_2CO_3 added			
Time of aeration in min.	60°C. M.	80°C. M.	85°C. M.	85°C. W.	85°C. W.	Time of aeration in min.	45°C. M.	60°C. M.	60°C. W.
15			2.27	5.25	1.58	25			4.40
20		2.20				30		2.15	
25			2.97	6.05	1.94	45			5.70
30		2.55				50		2.45	
35			3.15	6.33	2.01	60	1.95		6.15
45	1.85	2.70	3.23	6.39	2.06	80		2.70	
55		2.84	3.32	6.39	2.06	90	2.35		6.50
75	2.30	3.05	3.40			110		2.85	
85			3.48			120	2.50		6.60
120	2.55					160	2.60	3.05	
150	2.60					180	2.65		6.75
180	2.70								
Standard value*	2.51	2.51	2.87	6.36	2.00		2.51	2.51	6.36

The figure given in the table is number of cc. of n/28 sulfuric acid neutralized by volatile base which corresponds to 1/10 of the volatile base-N in mg. %.

M : Mackerel flesh. W : Whale meat.

* Standard value : value obtained by the standard vacuum method at 45°C. and 70 mm. Hg.

らみると，揮発性塩基量の多少には影響されないようである。

更に之等の実験結果の内で注目をひくことは，温度上昇の影響がクジラ肉の場合とサバ肉の場合とで趣を異にしている点である。即ちサバ肉の場合には通気温度を 45°C. 以上に上昇すると，通気の進行と共に二次的に発生した揮発性塩基が順次駆逐されて一定値を示さなかつた。この現象は高温となる程，またアルカリ度が高い程，著るしかつた。他方クジラ肉の場合には通気温度を 85 °C. に上昇しても，僅かな過大値を示すのみで一定値を示した。之等の事実はサバ肉には 45°C. 以上になると弱アルカリ性で揮発性塩基を発生する母体を含むことを示唆するものであり，この本体は魚肉に特有な物質か，或はまたこの本体は如何なる化合物であるかについては目下研究中である。

要するに以上の実験結果から，クジラ肉の場合には少くとも 85°C. で通気することにより定量時間を 30 分に短縮することができるが，サバ肉の場合には 45 °C. 以上に上昇して通気時間を短縮しようとの試みは定量の正確度の点から実現困難であることが判明した。しかし通気量を更に大きくすれば，完全駆逐に要する時間が短縮できるので，45°C 以上に加熱する時間が短くなり，二次的な揮発性塩基の発生にもとづく誤差を少くすることは可能であろう。

Ⅲ 総　括

揮発性塩基の通気定量法に於ける諸条件を検討して，次に示すような結果をえた.

1. 1時間 50 L の通気量で完全な定量結果をえる為に必要な通気時間は，通気装置の各部の大きさや湯浴中の浸漬部分の大小等によつて余り変らなかつた。

2. 45°C で通気定量する場合の必要通気時間は，除蛋白液中の酸の濃度と炭酸加里の添加量との比によ

つて著るしく左右された。従て除蛋白に使用する三塩化醋酸の量は食品衛生検査指針に示されたような変動を避け，成るべく一定とすべきである。

3. 45°C.，90 分の通気法値と標準減圧法値との開きは，鮮度のよい試料の場合には少く，鮮度低下の試料の場合には大であつた。

4. 通気温度を上昇すると定量時間を短縮できるが，サバ肉の場合には二次的に揮発性塩基を発生するので，定量に適当な通気時間を定めることは困難であつた。クジラ肉の場合には 85°C に於ても二次的な発生は殆どなく，30 分の通気で充分であつた。

終りに本研究は昭和 26 年度の文部省科学試験研究費及び厚生省厚生科学研究費（主任研究員　佐々木林治郎教授）により遂行したもので，こゝに謝意を表する。また実験の一部に助力された原田，井出両氏に深謝する次第である。

文　献

1. 富山哲夫，井出克巳，秋山勉：昭和 26. 11. 6，福岡に於ける日本水産学会臨時大会にて発表.
2. 富山哲夫，原田悠三：同上.
3. 河端俊治：同上.
4. 富山哲夫：食品の新鮮保持に関する研究，昭和 25 年度経過報告書，第 2 号，28 頁.
5. 厚生省：食品衛生検査指針，27 頁（1950）.

雑　　錄　（その六）

〔　〕内は経由した顧問名

受理番号	受理年月日	著　者	題　　名
212	27～5～22	神田献二：	網地の縮結と魚群の網目の通過について　〔新野〕
213	～5～30	小幡彌太郎，丸谷貞次郎：	魚鱗箔の研究―Ⅰ.　〔小幡〕
214	～6～ 9	増田辰良：	イボニシ Purpura davigena KUESTER の空中活力と水分消失　〔久保〕
215	～6～14	河端俊治，昭井　博：	通気法による揮発性塩基定量に関する研究―Ⅰ. 定量条件の検討　〔右田〕

（以上 19 巻 5 号．昭和 28 年 8 月頃掲載予定）

303	～6～16	平尾秀一，山田充阿彌，菊池　嶺：	魚肉及び乳製品，マーガリン中のビタミン A の定量　〔東〕
304	～6～17	右田正男，松本重一郎，里見至弘：	硫酸銅による漁網防腐の研究―Ⅰ. 硫酸銅の簡易迅速定量法　〔右田〕

（以上印刷費負担）

食品の鮮度測定法に関する研究—Ⅵ·
蒲鉾の鮮度測定法に関する比較研究 *

富山哲夫・米康夫
（九州大学農学部水産化学第一教室）

日本水産学会誌
第十八巻 第十号 別刷
昭和二十八年三月十日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 18, No. 10, Mar. 1953

食品の鮮度測定法に関する研究—Ⅵ. 蒲鉾の鮮度測定法に関する比較研究 *

富山哲夫・米康夫
(九州大学農学部水産化学第一教室)

Studies on Methods for Determining Freshness of Foods—VI. A Comparative Study of Methods for Determining Freshness of "Kamaboko"

Tetuo TOMIYAMA and Yasuo YONE

No consistent value for the volatile base-nitrogen has been observed at the start of the spoilage of "Kamaboko" as reported by KIMATA who gave 30～40 mg% as a criterion for spoilage. Data have also been presented showing that, contrary to UCHIYAMA'S report, a 60 mg% value for volatile acid seems to be inadequate as the criterion for beginning of spoilage.

It has been clearly shown that the catalase activity on the surface of "Kamaboko" shows a parallel relationship to the degree of growth of micro-organisms. This datum infers a possibility of presenting a new method for expressing freshness of "Kamaboko".

Ⅰ. 緒　　言

蒲鉾の鮮度の客観的測定方法としては，揮発性塩基量，pH 及び酸度，或は揮発酸量によるもの等が発表されている。例えば木俣氏[1]は無糖蒲鉾の外観の変化が現われ始める頃のアンモニヤ窒素量は30～40 mg%の附近と報告し，清水氏[2]は10g 試料を中和するに要する $^{n}/_{28}$ NaOH が 2cc に達した時を腐敗点としている。また最近に内山，横山両氏[3]は揮発酸が醋酸に換算して60mg% に達した時を腐敗の初期としている。

しかし実験の部に示すように，著者等は無糖の蒲鉾について揮発性塩基量及び揮発酸量と初期腐敗との関係を吟味してみた結果はいづれも前記の研究者等の値と一致しなかつた。しかも木俣氏の報告せるように無糖と含糖とによつて之等の標準を一律に定め難いとすれば，応用の点では甚しく不便である。依て更に適切な鮮度測定法を探すことは蒲鉾の鮮度保持研究の重要な第一段階である。

夫故に著者等は微生物による蒲鉾表面の汚染度を知る方法につき探索を試み，表面に生じたネト或は黴の発生部位のカタラーゼ作用力について予備試験を行つたところ，顕著な作用が認められた。勿論微生物の種類によつてこの作用に強弱はあろうと思われるが，この方法による鮮度測定の可能性が残されている事を知つた。以下之等の研究結果を取纏め比較検討したい。

Ⅱ. 實驗結果及び考察

1. 蒲鉾の初期腐敗と揮発性塩基量との関係.

蒲鉾の揮発性塩基量はその原料の鮮度，種類及び水晒の程度等により必ずしも同一とは考えられないの

* 九州大学農学部水産学教室業績

て，著者等は同一工場に於て時期を異にして製造された蒲鉾を用いてこの関係につき木俣氏の研究結果を追試した。即ち測定試料としては表面より1cm迄の層を用い，大型密閉罐中に放置中の揮発性塩基量を富山・原田の高温迅速定量法により定量した結果をみると，Table 1 に示すように，官能検査による腐敗の初期に於ては漸く 10～15mg% に達したに過ぎなかつた。また夥しい微生物が表面に繁殖した時期に於ても 20～25mg %であつて，木俣氏の示す値には達しなかつた。しかもこの値は製造時期により余り変動していない。之等の実験では殆ど近似の温度に放置したにも関らず製造時期によつて腐敗の初期に達する時間が異るのは興味多く，恐らく原料の細菌汚染度の差に基く結果であろう。なお試料蒲鉾の配合はすり身 91～94%，馬鈴薯澱粉 5～8%，及び塩 1%より成り味の素及びサッカリン少量を混じたものである。

Table 1. Relationship between the volatile base-N and the organoleptic change.

Date of prepn.	Oct. 17, 1951 incubated at 24～30°C.				Oct. 23, 1951 incubated at 22～28°C.						Feb. 21, 1952 incubated at 26～27°C.									
	A[1]		B[2]		C[3]		D[1]		E[2]		F[3]		G[1]		H[2]		I[3]	
No. of sample	Micro-org.	Vol.base-N	Micro-org.	Vol.base-N	Micro-org.	Vol.base-N	Micro-org.	Vol.base-N	Micro-org.	Vol.base-N	Micro-org.	Vol.base-N	Micro-org.	Vol.base-N	Micro-org.	Vol.base-N	Micro-org.	Vol.base-N
Test-item / Time on incubation(h.)	mg%		mg%		mg%		mg%		mg%		mg%		mg%		mg%		mg%	
24	±	28.8	−	10.2	−	5.8	−	10.6	−	15.2	±	7.9	−	10.6	−	9.6	−	8.0
48	+++	34.8	+	12.4	±	9.0	±	17.8	±	18.9	±	8.3	±	22.0	+	22.4	−	9.5
72	+++	—	++	—	+	—	+++	20.6	+++	23.2	±	13.0	++	27.9	++		±	12.3
96	—		+++		++		++	29.8	++		++		+++					
120	67.7		29.0		16.2													

1) Without any treatment, the volatile base-N being nearly 3.3 mg% at start of experiment.
2) Irradiated by ultra-red ray for ten minutes at start of expt.
3) Irradiated by ultra-violet ray for fifteen minutes at start of expt.

2. 蒲鉾の初期腐敗と揮発酸量との関係.

内山氏等と同様に FRIEDEMANN 法[5] を用い，内山氏の提唱する 60mg% の値を追試した結果は Table 2 に示す通り，官能検査によると24～30時間で食品として不適当な限界に達しているが，揮発酸は 14mg% 程度に過ぎなかつた。更にネトが全面を蓋い黴，黄色細菌が点在したような悪変状態でも 38mg% 程度に過ぎなかつた。実験例は極めて少いが，内山氏等の報告した 60mg% と一致しなかつたのは，供試料に何か原因があつたのか，或は初期腐敗の官能検査の標準を異にするためか，いづれかの原因かと思われる。もし第一の原因であるとすれば，揮発酸による判定値は一般化し難いことを暗示する。第二の原因であるとすれば，蒲鉾の初期腐敗の標準のとりかたを規正する必要が生じてくるが，著者等の考えでは食用の可否に標準をおくよりも寧ろ蒲鉾の商品価値が失われる状態におく方が安全であり且つ判定も容易ではないかと思う。

なお著者等の実験に於ても内山氏等の定量用試料のとり方と全く同様に実施したが，実験中に次の点に疑問をもつに至つた。即ち蒲鉾の立体的部位によつて鮮度低下程度の著るしく異るものを上下層の区別なしに試料をとることは，変敗の大きい表面部位を変敗の小さい内部肉で稀釈する結果となるので，半片や竹輪の

Table 2. Relationship between spoilage of "Kamaboko" and amount of volatile acids.

Time on incubation (hrs.)	Volatile acid expressed as acetic acid mg%	Organoleptic examination					
		"Neto"	Yellowish colonies of bact.	Fungi	Fermenting odor	Decaying odor	Good ○ or no × as food
2	7.6	−	−	−	−	−	○
24	14.0	+	−	−	−	±	?
30	——	+	+	−	−	+	×
49	38.2	+++	+	+	±	+	×
72	115	++++	+++	+++	++	+++	×

ように薄肉のものでは比較的に揮発酸の急増する点を捕捉することはできても，板付蒲鉾の場合には全体の揮発酸含量が表面の含量程には急激に変化することなく，従て腐敗初期の判定に困難を感ずるのではないかとの疑いがある。この点は更に検討して明かにしたい。

3. 蒲鉾の初期腐敗と表面のカタラーゼ作用力との関係。

一般に微生物の多くは過酸化水素分解力を示すので，蒲鉾の表面のもつカタラーゼ作用力は微生物による汚染度を示すのではないかと推察される。依てネト，黴等の発生部位を径1cm円形に切りとり，その2枚を用いてカタラーゼ作用力を著者等の検圧法[6]によつて測定してみた。先づ同一蒲鉾について細菌或は黴の発生した部位と発生しない部位に於けるカタラーゼ作用力をみると，Table 3 のようにネト或は黴が繁殖した部位は繁殖しない部位に比し著るしくカタラーゼ作用力が大であつて，微生物による汚染部位が明瞭にわかる。

Table 3. The effect of extent of growth of micro-organisms on catalase activity.

No. of sample	Organoleptic test		Catalase activity		
	"Neto"	Fungi	Readings of manometer		
			2 min.	4 min.	5 min.
A	−	−	6	8	10
	+	−	86	160	
B	−	−	10	13	15
	+	−	180		
C	−	−	3	5	6
	−	+	116	196	>200
D	−	±	4	6	7
	−	+	24	44	56
E	−	±	4	6	8
	+	−	>200		

次に黴，ネト其他の細菌による汚染部位を比較してみると，Table 4 のように黴の発生部はカタラーゼ作用力が小であつた。この場合には菌体の単位体重当りの作用力ではないから，これらの値は微生物の種類による強弱を示すものではないこと勿論である。しかし表面に繁殖した微生物の種類が雑多であるために，カタラーゼ作用力が不均一であることは免れないので，測定試料の採取方法が問題

Table 4. The catalase activity of surface covered with different kinds of micro-organisms.

Treatment	Kinds of micro-org. grown on surface	Catalase activity after incubation for 120 hrs. at 26°C.		
		Readings (mm) at		
		2 min.	4 min.	6 min.
No	Fungi	14	26	36
	Bact.	42	74	108
BHC 1/1000	Fungi	38	66	90
	"Neto"	148		
Gallate 1/1000	Fungi	20	44	66
	Bact.	72	120	158
Surface treated with 3% H_2O_2	Fungi	16	30	42
	Bact.	38	68	92

となつてくる。

以上の実験によつて外観的変化と表層部のカタラーゼ作用力とが平行することを知つたので，蒲鉾を26°Cに保存中の外観及び臭気の変化とカタラーゼ作用力の変化とについて吟味してみた。なおこの場合には部位による不均一性を出来るだけ除くために，任意にとつた径1cm大の円形の試料4個を反応室に入れて作用力を測定した。その結果はTable 5に示すように外観及び臭気の変化よりみて明かに腐敗の初期とみられる時期にカタラーゼ作用力が急激に増加するのを明らかに認めた。しかしこゝに注意すべき点は同一経過時間に於ても個体によつて変異が著るしかつた。これは個体による差以外にこの場合の試料採取方法では全体の代表的値を示すことが困難なことにも原因すると思われるので，今後はこの点の改良が必要である。

Table 5. Change in catalase activity of the surface during incubation at 26°C.

Time on incubation	No. of sample	Organoleptic test			Catalase activity (5min.)
		"Neto"	Fungi	Odor	
0	A	−	−	−	1
0	B	−	−	−	0
24	C[1)]	±	−	−	4.5
24	D[1)]	±	−	−	6.0
48	E[2)]	††	††	+	148
48	F[2)]	††	††	+	104
48	G[3)]	+	+	±	62

1) A few yellowish colonies of bacteria developed on side part of the sample.
2) Yellowish flora of bacteria covered all over the surface.
3) Yellowish flora of bacteria covered about ⅓ and Fungi covered about ⅔ of the surface.

III. 總　　括

1. 無糖蒲鉾の鮮度判定の標準として木俣氏が提唱した揮発性塩基量 30～40mg% は不適当である。
2. 内山氏等が提唱する揮発酸 60mg% は本研究の結果からみると，過大のようにみえる。
3. 微生物による蒲鉾の汚染度は，蒲鉾表面の示すカタラーゼ作用力によつて定量的に示すことができる。
4. 蒲鉾を室温に放置中に於て外観及び臭の変化が現われ始めた時に，カタラーゼ作用力は急増した。

本研究は厚生省の科学研究費（主任研究員佐々木林治郎教授）によつて支弁した。研究の機会を与えられた佐々木教授に深謝する。また熱心に助力された原田悠三氏，広渡一之氏及び菅原憲典氏に深謝の意を表する。

文　　献

1. 木俣正夫：日水会誌., **16**, 457～460 (1951).
2. 清水　亘：水産製造会誌, **3** (4) (1935).
3. 内山　均，横山和吉：水産研究所利用部鮮度保持研究班連絡情報，No.2，27～39 (1952).
4. 富山哲夫，米　康夫：蒲鉾の保蔵に関する研究，日本水産学会臨時大会，昭和26年11月（福岡），日本水産学会年会，昭和27年4月（東京）.
5. FRIEDEMANN, T. E. : J. Biol. Chem., **23**, 161～184 (1938). 水産研究所利用部鮮度保持研究班連絡情報 No. 1, 6～8,(1952).
6. 富山哲夫，米　康夫：日水会誌., **16**, 22～24 (1951).

食品の鮮度測定法に関する研究——Ⅶ. 蒲鉾の鮮度の一新簡易測定法*

富山哲夫・米 康夫・菅原憲典
(九州大学農学部水産化学第一教室)

Studies on the Method for Testing the Spoilage of Food——Ⅶ. A New Rapid Method for Determining Freshness of "Kamaboko"

Tetuo TOMIYAMA, Yasuo YONE and Norisuke SUGAWARA

Taking into account facts that the catalase activity of the washing of the surface was far greater than that of the inner part and became nil on boiling for five minutes, it is clear that the activity originates from micro-organisms developed over the surface. So, the catalase activity at any suface of "Kamaboko" will give an index for degree of loading with microorganisms.

The present data show that the freshness of "Kamaboko" can definitely be estimated by the action of the catalase activity determined on a 5 cc portion of washing of its surface with 250 cc water using a tooth-brush. A manometric procedure has been described.

Ⅰ 緒 言

富山及び米は第6報[1]に於て，蒲鉾の鮮度測定には揮発塩基及び揮発酸の値は信頼性に乏しいことを明かにし，他方鮮度低下中に於ける蒲鉾表面のカタラーゼ作用力の変化は官能検査成績とよく平行することを報告した。依て不均一な表面のカタラーゼ作用力の測定法が適当に改良できれば，簡易測定法としては従来のどの方法よりも優るであろうと考えて本研究に着手した。種々吟味を行つた結果，予想通りに迅速で簡易な一新測定法を決定できたので，以下その詳細を報告する。

Ⅱ 簡易鮮度測定法

A. 試薬及び装置：1) 3% 過酸化水素水。2) 検圧計式カタラーゼ測定装置[2]。3) 歯ブラッシ。

B. 方 法：歯ブラッシを用い蒲鉾表面を 250 cc の蒸溜水或いは水道水によつて充分に洗滌する。この洗液をよく混和した後，その 5 cc を測定装置の主室にとり，他方 3%過酸化水素水 5 cc を側室に加える。次に検圧計並びに側室の活栓をはめ，活栓を廻して穴を合せ内外の圧力を平衡させる。次で活栓を廻して気密とし，装置を傾けて側室の過酸化水素水を主室の洗液に混和し，緩やかに5分間振盪した後，検圧計の両水銀柱の差を読む。この差が 50 mm Hg 以下であれば，食品として安全と見做す。

Ⅲ 実験結果及び考察

1. カタラーゼ測定用試料採取法の吟味

前報においては径 1 cm の円形の蒲鉾表面についてカタラーゼ作用力を測定したので，個体或いは部位による差が大きかつた。もし全表面より試料を調製すればこの差異は現われない筈であるから，表面を適当に掻きとるか或いは水洗する方法が先ず考えられる。著者等はブラッシを用いて 50 cc の水で充分に表面を洗

1953 年 3 月 30 日受理 (印刷費負担). * 九州大学農学部水産学教室業績

濯し，その洗液 5cc についてカタラーゼ測定を試みた。この場合に注意されたことは，外面が微生物で汚染されるに從つて肉片が洗液に混入して不均一となつた。依て均一な試料をえるために濾過した後，作用力を検したところ多数の試料についてみると，懸濁液に比し 9～37％ 低値を示した。即ち微生物は大部分肉片に膠着しているものと思われるので，測定には懸濁液を用うべきである。

Table 1. The removal of catalase activity from the surface by washing with different kinds of brush and by repeating washing.

Kinds of brush & dilution / No. of washing	Gummy brush			Haired brush		
	No dil.	1/5 dil.	1/10 dil.	No dil.	1/5 dil.	1/10 dil.
1 st Washing	485*	97	47	515*	103	49
2 nd Washing	51	26		21	11	
3 rd Washing	9.0			2.0		

* calculated from a value obtained on a sample 1/5 diluted

また歯ブラッシの種類により或いは洗濯の回数によつて洗液の作用力が如何に変動するかを検討した結果は Table 1 に示すように，ゴムブラッシの場合には第2回及び第3回洗液は第1回洗液のそれぞれ 10.5% および 1.9%であり，毛のブラッシの場合にはそれぞれ 4.1% 及び 0.4% であつた。從つて毛のブラッシを用うれば，一回の洗液で表面のカタラーゼ作用力を殆ど完全に除去できることが明かとなつた。

2. 洗液の稀釈によるカタラーゼ作用力の変化

蒲鉾全表面を水 50cc により洗濯した液 5cc を作用力測定に用うると，外観の変化が明かに認められる頃には作用力は 200 mm Hg 以上となり，屢々検圧計が繰り合せを離れるために測定不能となつた。從つてこのような場合には洗濯原液を更に稀釈して作用力をみるか，或いは更に多量の水で洗濯した液の作用力を測定せねばならない。それ故に定量法としてはどの操作がよいかについて吟味を行つた。

洗液を稀釈することによつてカタラーゼ作用力がどの程度減少するかを Table 2 及び 3 に示した値から検討すると，概ね比例関係が認められる。しかし本法を実地に応用する場合には，稀釈操作は煩雑であるから，最初から多量の水を使用することを試みた。その結果によると，カタラーゼ作用力 183 mm Hg の原液を 1/5 及び 1/10 に稀釈した時の値はそれぞれ 36 及び 17 であつたのに対し，最初から 250cc および 500cc の蒸溜水を使用してえた洗液はそれぞれ 36 及び 18 を示した。次に多量の水で洗濯するのは，現場測定では多量の蒸溜水を要するので，水道水を用いてみた結果では，蒸溜水による 1/5 及び 1/10 稀釈の場合，それぞれ 47 及び 21 のものが，水道水を用うるとそれぞれ 48 及び 21 を示した。以上の吟味の結果から定量法としては，250cc の水により歯ブラッシを用いて表面を充分に洗濯する方法を採用した。

3. 蒲鉾の鮮度低下とカタラーゼ作用力との関係

蒲鉾の全表面の洗液を用うることによつて表面の部位によるカタラーゼ作用力の差異をなくすことができたので，蒲鉾を一定温度の密閉罐に放置した場合に作用力が如何に変化するかを吟味してみた。即ち無塵板付蒲鉾を市販のまゝのもの，紫外線を1時間照射したもの及びセロハン包装後 10 分間蒸煮したものを 35°C. に放置した場合の表面，1cm 下層及び底層に於ける作用力を測定した結果は Table 2 の通りである。これをみると表面洗液の 1/10 稀釈液が示す作用力と鮮度低下とはよく比例している。またこの洗液を 5 分間煮沸することにより作用力は破壊されること，及び表面より 1cm 下層では作用力が本実験の放置時間の範囲では殆ど増加しなかつたことからみて，表面の作用力の由来は微生物以外にはないと考えられる。

こゝに興味多いことは Fig. 1 にみられるように，放置中の蒲鉾内部の作用力増加は殆ど認められないのに，板のすぐ上部には徐々に作用力が増加したことである。戸沢氏等[3]の結果即ち板を殺菌しても内部の変敗速度は変らなかつたことを是認すれば，上記の原因は板に接した外部の変敗が早いために下層の変敗が早く現われたためと考えざるをえない。この点は将来にまつとして，製造上注意を要することであろう。

Table 2. Relation between organoleptic changes and increase in catalase activity.

No. of sample	Catalase activity at 5-min.					Neto**		Fungi	Decaying odor	Good, ○, or no, ×, as food
	Washed with 50 cc water	After boiling	1/10 diluted	Layer 1 cm below surface	Bottom-layer	All over surface	Scat-tering			
A 1)	3.0	1.0				−	−	−	−	○
B 1)	2.0					−	−	−	−	○
C 2)	>200*	3.0	135	0.5	40	++		−	+	×
D 2)	>200*	1.0	178	6.0	54	++		−	+	×
E 3)	>200*	3.0	94	—	—	++		−	+	×
F 4)	>200†	2.0	18	5.0	14	−	+	−	±	?
G 4)	113	1.0	8.0	6.0	19	−	±	−	±	○
H 5)	46	2.0	5.0	2.0	8.0	−	±	−	−	○
I 5)	57	1.0	5.5	2.0	10	−	±	−	−	○

1): was incubated at 26°C. for 7 hrs.; 2)~5): were incubated at 35°C. for 19-21 hrs. after kept at 26°C. for 7 hrs. 2): covered with yellowish flora of bacteria. 3): yellowish flora developed only on surface not covered with cellophane. 4): yellowish flora developed only on side surface; samples F and G were irradiated by ultraviolet ray for 60 minutes at the start. 5): before incubation, samples H and I were entirely covered with cellophane, followed with steaming for ten minutes. * Values at 30-sec. reaction. † Values at 90-sec. reaction. ** Development of mucilagenous bacteria.

次に板付蒲鉾をそのまゝ 23°C. の密閉罐中に放置してカタラーゼ作用力の増加と揮発酸量との関係をみた結果は Fig. 1 の通りである。放置中の官能検査結果では，24時間目よりネトが発生し，腐敗臭が僅かに感ぜられ，30時間目には明かに腐敗臭があり，黄色細菌集落が出現し始めたので，この頃が初期腐敗とみなされた。この時期は作用力からみると，表面洗液の作用力が急激に増加し始めた時期であつた。しかしこの時期には揮発酸値が僅に 15~20 mg % 程度に過ぎなかつた事実は，明かに揮発酸定量用試料採取法及び鮮度低下の指標 60 mg % に再検討の必要を示唆する。

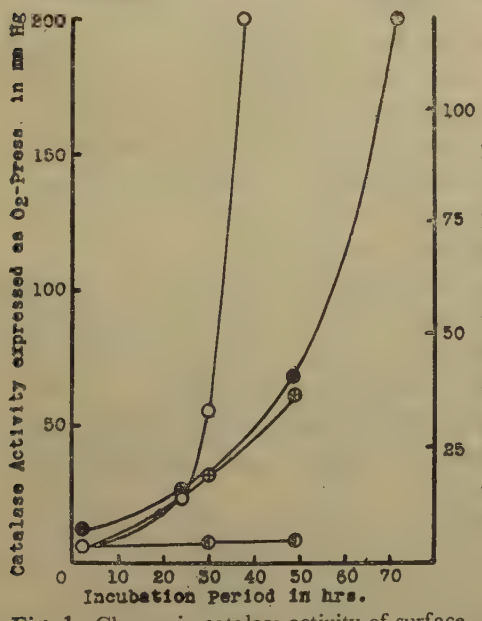


Fig. 1 Change in catalase activity of surface, inner part and bottom layer, and in volatile acid during the incubation. Surface, ○; inner part, ◐; bottom layer, ⊕. Volatile acid, ●.

更に鮮度判定の規準を求める参考として，鮮度低下の初期と作用力増加量との関係を検討してみた。すなわち無糖板付製品を密閉罐内に収容して 24°C に放置し，逐次，外観の変化及び作用力の変化について追跡し，Table 3 及び Fig. 2 に示すような結果をえた。これをみると 50 cc の水を用いた洗液の作用力が 200 mm Hg に達した頃より鮮度低下が始まり，1/5 稀釈のものが 50 mm 附近になつて，ネト及び黄色細菌が散見され，しかもこの値に達する少し前より作用力は急激に上昇して，典型的な自触媒反応の型を示した。また 21°C. に放置した同様の実験においても Fig. 2 に

Table. 3 Relation between initial stage of spoilage and value for catalase activity.

Time on incubation at 24°C.	Catalase activity at 5-min.					Neto **		Decay odor	Good, ○, or no, ×, as food
	No dil.	1/5 dil.	1/10 dil.	Inner part	bottom part	All over surf.	Scattering		
0 hrs.	2.0	2.0	0.5	0	0.5			−	○
17.5	52	6.0	3.0	0	4.0			−	○
19.5	101	12	5.0					−	○
23	182	22	7.0					−	○
26	200	46	11				±	±	○
30	200*	91	34				+	±	?
32	200*	115	42				+	+	?
39		200	120	2.0	8.0	−	++	++	×
42			135			+++		+++	×

* Values at one minute-reaction. ** Development of mucilagenous bacteria.

示すように，同じ傾向が認められた。依てこの値を以て食品価値を失う限界と定めた。勿論この値は将来多数の試料について検討してから決定さるべきであるが暫定的に以上の結果を基にしてこの値を提唱する。

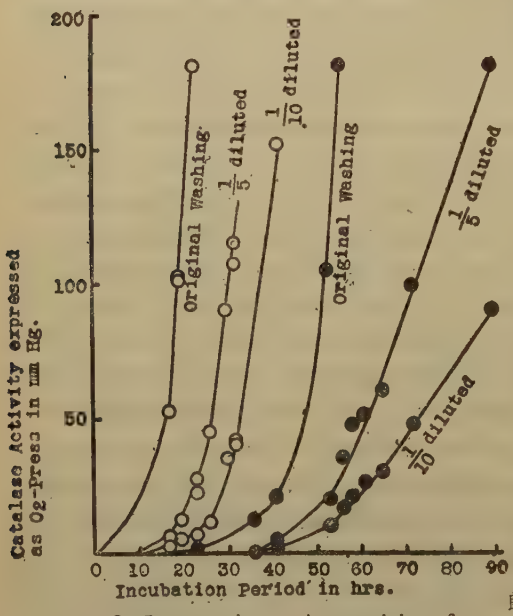


Fig. 2 Increase in catalase activity of surface of "Kamaboko" during the incubation. The activity at 24°C., ○; at 21°C., ●.

Ⅳ 総　　括

1. 蒲鉾表面のカタラーゼ作用力を測定するには，全表面を 250 cc の水で歯ブラッシを用い，充分洗滌してえられる懸濁液が適当である。一回の洗滌によつて表面の作用力を 96% 除くことができた。

2. 表面の洗液を煮沸すると作用力が消失したこと，また内部の洗液には殆ど作用力が認められないことから考えて，この作用力は明かに表面に繁殖した微生物に由来するものである。

3. 無糖板付蒲鉾を 24°C., 及び 21°C. の密閉器内に放置した場合，食品価値を失う点と表面洗液の作用力の急昇点とは一致した。この点は洗液 5 cc の作用力が 50 mm Hg を示す時である。

本研究は厚生省の科学研究費（主任研究員佐々木林治郎教授）によつて支弁した。こゝに謝意を表する。

文　　献

1. 富山哲夫，米　康夫：日水会誌. **18**, 521～524 (1953)
2. 富山哲夫，米　康夫：日水会誌., **16**, 22～24 (1951).
3. 戸沢晴巳外5氏：水産研究所利用部・鮮度保持研究班連絡情報，No. 3, 22～29 (1952).

β-ELAEOSTEARINE と QUINONE との附加反応について

石尾眞彌・富山哲夫

On the addition reaction between β-elaeostearine and quinone

Shinya Ishio and Tetuo Tomiyama

九州大學農學部學藝雜誌 第十三卷 別刷
Reprinted from the Science Bulletin, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Vol. 13, Nos. 1~4, November, 1951

β-ELAEOSTEARINE と QUINONE との附加反応について*

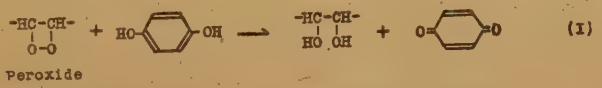
石 尾 眞 彌・富 山 哲 夫

On the addition reaction between β-elaeostearine and quinone

Shinya Ishio and Tetuo Tomiyama

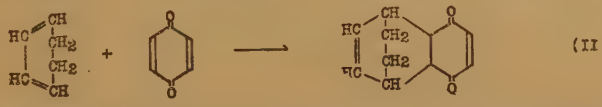
I. 緒 言

Hydroquinone（HQ）類の油脂酸化防止機構が，油脂過酸化物を還元破壊することによつてその酸化触媒能を喪失させることにあるとすれば，沃化水素による peroxide の還元機構と類似の反応に従つて



（I）式の反応を起し，茲に quinone（Q）が生成される筈である．然し HQ 類の顯著な効果を説明する為には，この Q が何等かの方法によつて再び HQ に還元され，繰り返へしてこの反応に与かると考えなければならない[3,4]．

然るに Q は，分子中に -CO-CH=CH-CO- なる基を有する為に，共軛 diene 類と



（II）式の反応を起し得るから[5]，これと類似の反応は共軛二重結合を含む elaeostearine 或は vitamin A との間に起る可能性も亦大きい．従つてこれ等の不飽和化合物を含む油脂に HQ を添加して抗酸化能を与へようとする場合には，（I）式に従つて生成された Q は，これ等の不飽和化合物と附加反応を起して，酸化防止の反応系より除去され，その為に HQ の一方的消費が進行して，その酸化防止効果は著しく低下する事が予想される．この点に就いて吟味する為に，桐油より β-elaeostearine を純粋に分離し，Q との附加反応を検討することにした．

II. 実 驗 方 法

1） β-elaeostearine（以下 β-El と略記す）；桐油 200 g を激しく攪拌しつつ 0.1 gr の沃度を含む benzol 20 cc を徐々に滴下し，α-El を β-El に異性化する．これに 100 cc の純 acetone を加へて攪拌し，低度不飽和酸の glyceride を溶出し，速かに濾別する．更に acetone による洗滌を繰り返へして白色結晶の β-El を分離する[6]．mp. 59－60°C

---

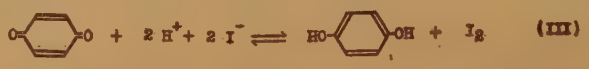
* 九州大学農学部水産学教室業績．Peroxide に関しては，最近別な構造が與へられてゐる[1,2]．

を示した.

2） 反応速度測定法； Q が β-El に対して附加反応のみをなすならば，反応系中に残存する Q の定量のみを以て反応の進行状態を検し得るけれども，Q が酸化作用を β-El 或は β-El-Q 附化合物に及ぼして，脱水素反応をなす可能性も考へられるので，Qの定量と同時に HQ の定量も併せ行ふことにした.

反応容器は容量約 100 cc の球形の反応室と，高さ 40 cm の冷却管よりなる．両部の接続は熔接を以てした．熱時溶剤の揮散するのを防止する為に，冷却管の先端にゴム帽を被せた．この反応容器に β-El 及び Q の toluol 溶液を入れ，これを油浴中に浸漬加熱し，toluol の沸点 110°C に於て反応を行つた．一定時間毎に，ゴム管の先に 1 cc のホールピペットを付け，冷却管の上端より反応室へ挿し入れ，1 cc 以上を吸ひ上げる．ピペット内容の温度が室温に低下した時，正確にその 1 cc をとり，従来の定量法[7,8]を次のように改変して Q 及び HQ の定量を行つた.

a） Q 定量法； 反応溶液 1 cc を共栓付 100 cc 容フラスコにとり，10 % 沃度加里溶液 10 cc 及び濃塩酸 0.1 cc を加へて激しく振盪すれば，



(III)

(III) 式の反応により，沃度が遊離されるので，この沃度を $\frac{N}{100}$ チオ硫酸ソーダで滴定する．指示薬として，1 % 可溶性澱粉溶液を使用する.

b） HQ 定量法； 反応溶液 1 cc をとり，$\frac{N}{100}$ 沃度水溶液 30 cc を加へる．しかる時は，(III) 式の逆反応に従つて沃度は消費される．しかし HQ-Q 系及び I_2-HI 系の酸化還元電位から計算すれば明かなように，この反応は完結しない中に平衡状態に達する．従つて上式の反応を完結させる為に，別の小容器に 0.5 gr の沈降性炭酸石灰をとり，水 15 cc を加へて懸濁させ，これに一滴の濃塩酸を加へた Buffer* を作り．これを反応液に注加する．その時は直ちに反応は完結するので，残存する沃度を $\frac{N}{100}$ チオ硫酸ソーダで滴定する．終点は 1 % 可溶性澱粉液を数滴加へて正確を期する.

c） Q及び HQ 定量中に起る β-El の沃度吸収作用； 上述の Q 及び HQ 定量法は極めて僅かの誤差を与へるに過ぎないが，これ等の定量法は沃度滴定法であるから，反応液中に溶存する β-El によつて沃度が吸収される懸念がある．この点を確める為に β-El の 3.401 gr. をとり，toluol に溶解して 100 cc となし (39.0 mMol/L)，その 1 cc をと

第　1　表.

放置時間 (分)	$\frac{N}{100}$ チオ硫酸滴定値 (cc)	吸収沃度 (%)
0.0	13.95	0.00
1.0	13.90	0.33
11.0	13.58	2.67
15.0	13.42	3.66
20.6	13.30	4.67
25.0	13.05	6.33

* 沈降性炭酸石灰中に含まれる酸化カルシウムが除かれる.

り，$\frac{N}{100}$沃度溶液の 15 cc を加へ，濃塩酸 0.1 cc を加へて振盪し，Q 定量時に於ける反応條件と一致させ，β-El が沃度水溶液より吸收する沃度の量を時間的に測定した．測定結果は第1表に示した．放置時間は沃度水溶液の加へ終りから，$\frac{N}{100}$チオ硫酸ソーダ（F=1.075）で滴定を始める迄の時間で示した．

第1表に示される様に，放置時間 11 分にして注加した沃度の 2.67 % が吸收された．HQ 定量時に於ける反応で，同様の試驗を試みた結果は第1表と大差はなかつた．Q及び HQ の定量には，5分以上を必要としないから，定量中その為に惹起される誤差は 2 % に達することはないものと考へられる．

III. 実 驗 結 果

実 驗 I； β-El 及び Q の初濃度夫々 39.0 mMol 及び 125.9 mMol の toluol 溶液を 110 ℃ に保ち，一定時間毎に溶存Qを定量して消失Qを計算し，また生成 HQ を直接定量した．附加Qは消失 Q と生成 HQ との差として求めた．これ等の諸点を Plot して，各々の曲線を求めた．

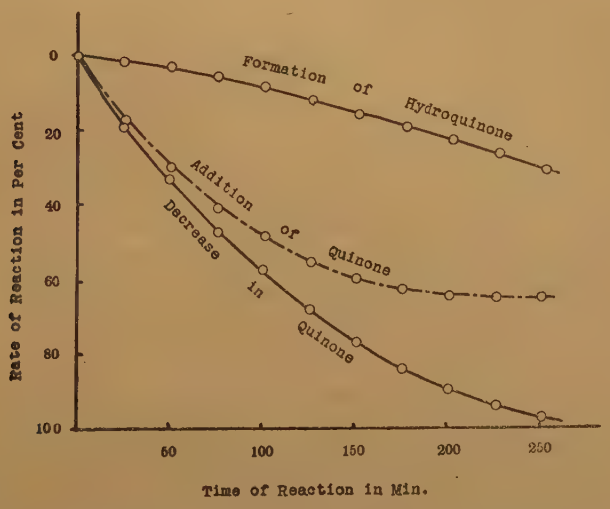


Fig. 1. The reaction between one mol of β-elaeostearine and three mols of quinone. The curves show the rate of decrease in quinone and formation of hydroquinone with time of the addition reaction at 110 ℃. The amount of quinone in form of the addition compound was calculated from the difference between amount of decreased quinone and newly ormed hydroquinone.

HQ の生成速度は反応時間の経過と共に增大し，200 分以後には Q の消失速度と一致した．即ちこの反応時間に至れば，消失する Q は総て HQ として生成され，β-El と Q との附加反応が停止することを示すものである．從つて筆者等は，この反応停止で，或段階の

附加反応は完了し，β-El は総て反応に与つたものと看做し，β-El とQの附加反応について Mol 比を求めた結果，第2表に示すように β-El の 1 Mol に対しQの 2.05 Mol が附加する事を見出した．

第　2　表.

反応時間（分）	β-El (mMol)	溶存Q (mMol)	消失Q (mMol)	生成 HQ (mMol)	附加Q (mMol)	β-El, Q 附加反応に於ける Mol 比	β-El と生成 HQの Mol 比	反応溫度
0	39.0	125.9	0	0	0	1 : 2.05	1 : 1.15	110℃
245	0	2.6	123.3	43.1	80.2			

この反応の終了後，加熱を止め，約20時間を経て反応容器内容物を検査の結果 β-El-Q 縮合生成物及び HQ が器壁に固着してゐた．これは β-El 及び添加Qの濃度が高過ぎた為に析出したものと考へられるが，若し反応進行中に既にこのような現象が存してゐたとすれば，HQ 及びQの定量結果に大なる誤差が含まれることになる．然し第1図より明かなように，消失したQは，総て HQ として生成されることが，その定量値によつて示されてゐるので，反応進行中この様な懸念は存しなかつたものと考へる．

実 験 II；実験Ⅰでは，β-El の1 Mol に対し，約3 Mol のQを添加して反応を進めたが，その結果Qの大部分は消失したので，実験 II では，β-El の1 Molに対して，Qを5 Mol の割合に添加し，反応は沸騰湯浴中で進行させた．茲にその方法を記せば次の通りである．

β-El 及び Q の初濃度が夫々 83 mMol 及び 415 mMol の Benzol 溶液を作り，これを ampule に封入し，沸騰湯浴中に約20時間保つた．実験Ⅰでは，110℃, 200 分の反応時間で附加反応は終了したので，100℃, 20 時間の反応時間では，附加反応は充分進行し，β-El の全部が反応に与つたものと考へ，内容物についてQ及び HQ を定量した．その結果は第3表に示した．

第　3　表.

反応時間（時）	β-El (mMol)	溶存Q (mMol)	消失Q (mMol)	生成HQ (mMol)	附加Q (mMol)	β-El, Q 附加反応に於ける Mol 比	β-El と生成 HQの Mol 比	反応溫度
0	83	415	0	0	0	1 : 3.02	1 : 1.97	100℃
20	0	0	415	164.7*	250.3			

*この実験では ampule の内面に HQ が結晶として析出し，猶 quinhydrone 様物質及び縮合生成物が固着してゐた．その為に ampule 中の溶液の部分を他に移し，固着物に 94 % ethanol を加へて加熱し，HQ の溶出を試み，両液を合し，この溶液中の HQ を定量して，その結果を示したものである．

実 験 III；実験 II で加へたQは，β-El の1 Mol に対し5 Mol に相当したが，全Qは消失した．従つて更に添加するQの濃度を増大し，1 Mol の β-El に対し，7 Mol の

Qを添加した場合について実験を行つた．即ち β-El 及びQの初濃度が夫々 15.8 mMol 及び 111.0 mMol の toluol 溶液を作り，実験 I と同様の方法で反応を進め，一定時間毎にその1 cc をとり，Q及び HQ を定量した．定量の結果及び観察事項は第4表に示す如くである．

第　4　表．

反応時間 (分)	消失 Q (mMol)	生成 HQ (mMol)	附加 Q (mMol)	観察事項
0	0	0	0	……反応液はQの黄色を呈す．
30	3.2	0	3.2	
60	15.3	2.8	12.5	
90	30.8	6.2	24.6	……反応液は赤褐色となる．
120	43.2	11.3	31.9	……冷却により quinhydrone が析出す．反応液は濃褐色となる．
150	55.0	16.7	38.3	
180	67.5	21.0	46.5	
210	79.5	25.2	54.3	
240	87.4	31.2	56.2	
270	93.7	37.5	55.7	……冷却すれば HQは微細な結晶として
300	97.1	33.5	—	析出し，反応液中に懸濁す．反応液
330	100.0	29.0	—	は淡褐色となる．
360	103.0	26.0	—	
390	105.8	24.0	—	……熱時 HQの析出が認められる．反応
420	107.8	22.0	—	液は淡黄色透明となり，縮合物は熱
450	108.2	18.0	—	時反応器の内壁に固着す．
冷却後	109.1	3.77	—	反応液は殆んど無色透明となる．HQ 及び縮合物が析出す．

生成 HQ 量は 270 分で最大値を示し，爾後漸減した．これは HQ が残存する Q と quinhydrone を形成して toluol 中に溶解してゐるが，反応時間の経過と共に，quinhydrone 分子中のQが消失し，HQ は free の状態となる．玆で HQ の toluol に対する溶解度が quinhydrone のそれよりも小なる為に，反応液中より析出し，HQ としての定量を免れることになる．その為にこのような結果になつたものと推察する．従つて玆に示された生成 HQ の減少は，單なる見掛上のものであつて，反応器中では HQ がその儘存在してゐるか，或は更に HQ の生成が続行されてゐたものと考へられる．試みに反応終了後，反応系に 94 % ethanol を加へて析出 HQ を溶解し，この全液についての HQ の定量をなした結果，54.8 mMol の HQ を検出することが出来た．然し反応器内には，反態縮合生成物が猶も固着し．この中に未だ残存すると思はれたので，更に ethanol を加へて溶出を試みたが，縮合生成物が不溶性の為，完全に HQ が溶出されたか否は疑問である．従つて実際には 54.8 mMol 以上の HQ が生成されたものと想像される．実験 III の結果を取纏めると，第5表に示される通りである．

第 5 表.

反応時間（分）	β-El (mMol)	溶存Q (mMol)	消失Q (mMol)	生成 HQ (mMol)	附加Q (mMol)	β-El, Q 附加反応に於ける Mol 比	β-El と生成 HQ の Mol比	反応溫度
0	15.8	111.0	0	0	0	1 : 3.55	1 : 3.45	110 ℃
450	0	2.8	108.2	54.8	56.2			

実 驗 IV; 実驗 III では β-El 及びQの濃度ろ高過ぎた為に, β-El とQの附加反応の Mol 比を決定する上に種々の不都合が存在した. その為に, この実驗では, これ等の濃度を著しく低くして反応を行つた. 即ち β-El 及び Q の初濃度が夫々 3 mMol 及び 20 mMol の toluol 溶液を作り, 実驗 III と同様の方法で反応を進め, 一定時間毎にその 1 cc をとり, Q及び HQ の定量をなした. その結果は第2図及び第6表に示した.

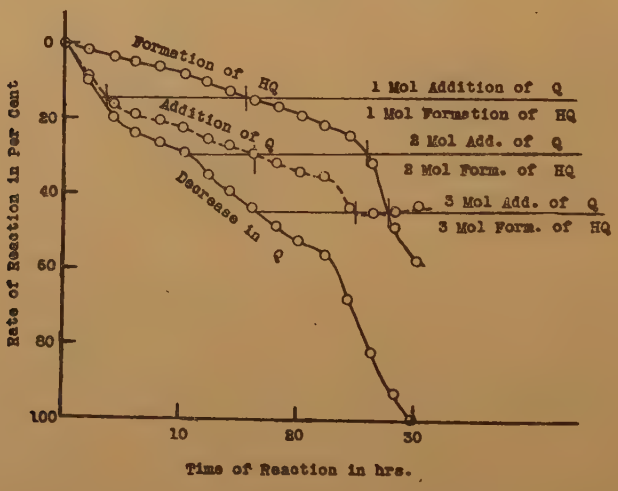


Fig. 2. The reaction between one mol of β-elaeostearine and seven mols of quinone. The horizontal lines indicate the calculated level of mols of quinone in form of the addition product and hydroquinone newly formed.

第 6 表.

反応時間（時）	β-El (mMol)	溶存Q (mMol)	消失Q (mMol)	生成 HQ (mMol)	附加Q (mMol)	β-El, Q 附加反応に於ける Mol 比	β-El と生成 HQ の Mol比	反応溫度
0	3.0	20.0	0	0	0	1 : 2.87	1 : 3.80	110 ℃
30	0	0	20.0	11.4	8.6			

この実驗では, 反応時間 24 時間で β-El とQの附加反応は完結し, 爾後反応時間 30 時

間に至る迄に消失したQは総て HQ に還元された．反応終了後，反応液を冷却したが，何等析出物は認められなかつた．反応時間 24 時間以後反応速度が増大したのは，反応室内に反応液が残り少くなつた為に，気相の toluol が反応液に比して比較的多くなり，反応液が濃縮された状態で反応が進行した為であらう．従つて，Q及び HQ の定量に於ては，この点に留意し，反応容器を油浴中から取出し冷却した後，反応液 1 cc を採つた．Q及び HQ の定量は半微量分析になつたので，誤差は幾分増大した．

以上の各実驗結果を要約すれば，第7表のようになる．

第　7　表.

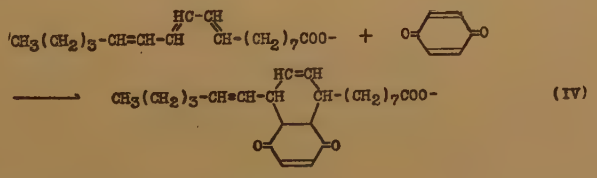
反応前に於ける β-El と Q の Mol 比	附加反応に於ける β-El と Q の Mol 比	β-El と生成 HQ の Mol 比
1 : 3.23	1 : 2.05	1 : 1.15
1 : 5.00	1 : 3.02	1 : 1.97
1 : 7.02	1 : 3.55	1 : 3.45
1 : 6.67	1 : 2.87	1 : 3.80

IV. 実驗結果に対する考察

β-El は β-El acid の tri-glyceride であるから，β-El と Qの附加反応は β-El acid と Q の附加反応と一応看做すことが出来る．従来 β-El acid には，共軛 diene 型[9] と共軛 triene 型[10] の構造が提出されてゐるが，最近の報告によれば，その紫外部の吸収スペクトル中に，共軛 triene 基の吸收帶の存在する事が記載されてゐるので[2]，筆者等は，β-Elacid は共軛 triene 構造を有つものとして考察を進める．

a）β-El acid とQの附加反応．

Morrel 及び Samuels 氏等の研究[11] によつて，無水マレイン酸は，β-El acid 共軛 triene 基 1.4 の位置に附加することが明かにされてゐる．而してこの反応は，共軛二重結合と −CO−CH=CH−CO− 基を有する化合物との間に共通する反応と考へられてゐるから，Qがβ-El acid に附加する場合にも共軛 triene1 .4 の位置に附加するものと推察される．この場合反応式は（IV）式に示される．



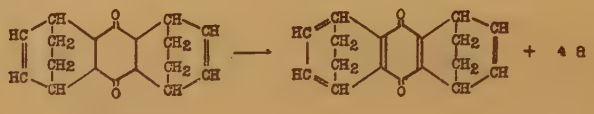
(IV)

b）附加化合物に対するQの脱水素反応．

第1及び第2図から明かなように，HQ の生成反応速度は，初期には極めて遅いが，反応時間の経過と共に増大する．若し Qが β-El に対して脱水素反応をなすものであるならば，反応速度は初期に於て大きく，反応時間の経過と共に，両物質の濃度は減少するか

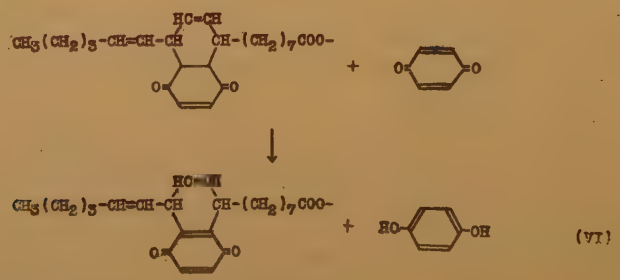
ら，この場合反応速度は次第に減衰する筈である．然し実際にはこれと全く相反するから，この場合Qは，反応時間の経過と共に濃度を増大する附加化合物から脱水素し，HQを生成するものと考へられる．また別の観点からすれば，附加化合物が，Qの β-El に対する脱水素反応を接触化するとも考えられるが，この点については以下に述べる附加化合物からの脱水素反応の可能性によつて解消されるであろう．

Diels 及び Alder 氏等の研究[5]によれば，Qの1 Mol と cyclohexadiene の2 Molとの附加化合物は，140°C に加熱すれば，（V）式に従つて容易に4原子の水素を放出する．



Di-adduct

これと同様の反応は Farbenind 氏[12]によつて，2, 3 dimethyl butadiene とQのdi-adduct についても報告されてゐる．然しこれ等の物質が各々1 Mol 宛附加した化合物については，水素を放出するかについてはその記載が見当らない．筆者等の実験で生成された附加化合物は（IV）式及び次に述べる所によつて明かなように，β-El 分子内では，β-El acid とQが各1 Mol 宛附してゐるので mono-adduct となつてゐるが，過剰Qの存在によつて脱水素される．この類似の現象は一般に云つて，分子が高分子になるに従つて起り易いものであるから，この脱水素反応も，mono-adduct ではあるが，その大なる側鎖のためと考えれば首肯されよう．従つてこの場合反応は下に示す（VI）式によつて説明される．



(VI)

c） 3 Mol を超過する HQ の生成

β-El の1 Mol に対し，Qの7 Mol を加へて反応を進行させた場合には，HQ の生成量は3 Mol を超過した．Qが附加化合物から脱水素して HQ を生成する反応が，（VI）式に示す機構によるものとすれば3 Mol 以上の HQ は生成されない筈である．従つてこのような超過は，Qが更に別の機構によつて附加化合物から脱水素するものと推察される．筆者等はこの点に徴し，Qの methyl oleate に対する脱水素作用の有無を検したが，この結果 HQ の生成が起り得ること[13]から，この様な副反応によつて，脱水素反応の生起し得べきことは，可能であると考えた．

d） β-El とQの附加反応及びHQ の生成反応に於ける Mol 比と反態機構．

第7表から明かなように，反応前の β-El とQの Mol 比によつて β-El に附加するQ

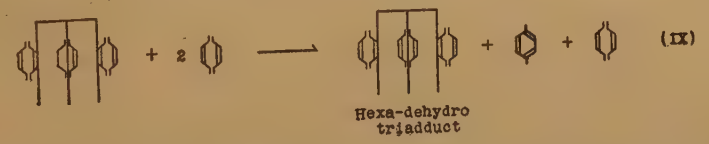
の Mol 数及び生成 HQ の Mol 数は異つた値を示したが，以上の考察によつて，これ等の反応機構は次の様に示される．

反応系に於けるQの濃度が，β-El の1 Mol に対して3 Molの場合には，第1図及び第2表から明かなように，最初Qの附加反応は速かに進行するが，3 MolのQが総て附加反応には与らず，1 Mol は HQ として生成されることより考へれば，その反応は（VII）式によつて示されよう．

反応系に於けるQの濃度が5 Molに増加される場合には，更に（VIII）式が追加される．

即ち，第3表及び第2図から明かなように，5 Mol のQが反応系に加へられた場合には，3 Mol のQが附加反応に与り，2 Mol の HQ が生成されてゐるので，反応機構は（VII）式及び（VIII）式によつて示される．

反応系に於けるQの濃度が7 Mol に増加される場合には，（VII）式及び（VIII）式に，更に下に示す（IX）式が追加されなければならない．



この場合には，Q の3 Mol が附加する事は第2図から明かであるが，HQ の生成量は3 Mol を超過し殆んど4 Mol に達する．この HQ の生成は（VI）に示した反応式以外の別の機構によつて起るので，玆では1 Mol のQが残存する様に示した．

更に β-El の1 Mol に対して，Q の 10 Mol を添加して反応を行つたが，附加Qは略3 Mol で，残余のQは総べて HQ に生成される実験を行つたが，この点については後報に譲る事にしたい．

以上の結果から共軛二重結合を分子内に有つ油脂或は vitamin A を含む肝油等を HQ によつて安定化する場合に，peroxide によつて生成されたQは，附加反応を起して，酸化防止の反応系より除去される可能性は大きいが，一方では HQ に還元されるので，この両反応速度の大小によつて，酸化防止能も相当異つてくるものと推察される．

V. 要　　約

1）β-elaeostearine（β-El）と quinone（Q）との附加反応の存在を明かにした．

2） この附加反応と平行して，hydroquinone（HQ）の生成反応の起ることを確めた．

3） これ等の反応機構に対して次式を与へた．

β-El＋3Q→Di-dehydro di-adduct＋HQ （VII）

Di-dehydro di-adduct＋2Q→Tetra-dehydro tri-adduct＋HQ （VIII）

Tetra-dehydro tri-adduct Q→Hexa-dehydro tri-adduct ＋HQ （IX）

4） β-El の1Mol に対し，Q が6Mol 以上過剰に存在すれば，別の反応機構によつて脱水素反応の起ることを指摘した．

本研究に助言を賜つた本学理学部教授澁谷眞一氏に謝意を表する．猶この研究は科学研究費によつてなされた事を附記する．

VI. 引 用 文 献

1） E. H. Farmer; Trans. Faraday Soc., 42, 228, (1946).
2） R. R. Allen and F. A. Kummerow; J. Oil Chemist's Soc., 28, 101, (1951).
3） C. Moureu and C. Dufraise; Rec. trav. Chim., 43, 645-8, (1924).
4） C. Moureu and C. Dufraise; J. Chem. Soc., 127, 1～4, (1925).
5） O. Diels and K. Alder; Z. Angew. Chem., 42, 911, (1929).
6） R. S. Morrell and S. Marks; J. Soc Chem. Ind., 50, 27T, (1931).
7） R. Willstätter und S. Dorogi; Ber., 42, 2165, (1909).
8） W. M. Gardner and H. H. Hodgson; J. Chem. Soc., 95, 1825, (1909).
9） 石尾正文；薬学雑誌，大正15年，228，(1926).
10） J. Böeseken und H. J. Ravenswoay; Rec. trav. Chim., 44, 241, (1925).
11） R. S. Morrell and H. Samuels; J. Chem. Soc., 134, 2251, (1932).
12） I. G. Farbenind; A.-G., Fr. Pat. (addition) 39, 333 〔C. A., 26, 2202, (1932)〕.
13） 石尾貞爾，富山哲夫；未発表．

Résumé

The addition reaction which takes place between β-elaeostearine and quinone at 100～110°C. has been studied to throw some light on the fate of hydroquinone which is added to the oil as an antioxidant.

The ratio between these two molecules which go into the addition reaction has been found to vary with their molecular ratio at the start of the reaction. In the case of the molecular ratio of β-elaeostearine to quinone being 1:3 and 1:5 or 1:7 at the start, the corresponding molecular ratio in the product was 1:2 and 1:3, respectively. It has further been found that in the course of this addition reaction hydroquinone always formed.

The data obtained by a quantitative study on the disappearance of quinone and the formation of hydroquinone conform to the following reactions depending on the molecular ratio between β-elaeostearine and quinone at the start of the reaction.

β-elaeostearine＋3 quinone→didehydro di-adduct＋hydroquinone （VII）

didehydro di-adduct＋2 quinone→tetradehydro tri-adduct＋hydroquinone （VIII）

tetradehydro tri-adduct＋2 quinone→ hexadehydro tri-adduct＋hydroquinone＋quinone （IX）

By taking into consideration the work of Diels and Alder, it is clear that the reactions shown above are most likely to take place.

インシュリン資源としての魚類の
ランゲルハンス氏島に関する研究. I

魚類ランゲルハンス氏島の生物学的観察

立　野　新　光

Studies on the Islets of Langerhans of fishes as a source of insulin. I

Biological observations on the Islets of Langerhans of fishes

Shinko Tachino

九州大学農学部学芸雑誌，第14巻　第2号，別刷，昭和28年9月28日

Reprinted from the Science Bulletin of the Faculty of Agriculture,
Kyushu University, vol. 14, no. 2, September 28, 1953

インシュリン資源としての魚類のランゲルハンス氏島に関する研究. I

魚類ランゲルハンス氏島の生物学的観察

立野新光

Studies on the Islets of Langerhans of fishes as a source of insulin. I

Biological observations on the Islets of Langerhans of fishes

Shinko Tachino

緒言

Brockmann 及び Stannius によつて発見せられ，Rennie によつて その機構が明らかにされた硬骨魚類の Langerhans 氏島（以下略してラ氏島と記す）は，哺乳動物の場合とは異り膵組織中に分散せずして Insulin を分泌する組織のみが集つて小塊をなし膵臓より孤立して存在するため，ラ氏島を原料として Insulin を製造する場合ラ氏島の摘出に際して膵組織の Trypsin により Insulin が分解されることがない．又哺乳動物の膵臓に比べ魚類のラ氏島中には極めて濃厚に Insulin を含有するを以て Insulin の抽出に当つては少量の薬品と簡単な操作にて高単位の Insulin を多量に製造することが出来るのである．然し実際産業的に Insulin を製造する場合なお幾多の問題が残されているので著者はその中製薬上重要な事項について研究を行つた．

実験結果及び考察

I. 魚類ラ氏島の生態

硬骨魚類のラ氏島はいづれも膵臓より孤立して結節状をなしているのであるが，その存在する場所，分布の状態，形状，大きさ，及び色沢は魚種によつて非常に異り，同種の魚類でも同一ではないので，ラ氏島を採取する場合魚体中のラ氏島に関する生態的知識が十分でなければならない．硬骨魚類のラ氏島について解剖学的見地からなされた研究はかなり多数あり，日本産魚類についても大沢，[1] 鵜飼[2]は数種の魚類について基本的研究を行つているし，末広[3]は 33 種の多きに亘つて詳細に記載している．又遠山等[4]も Insulin 抽出の研究の際簡単に記載しているが，これまでの研究のみではラ氏島採取の実際の手引とするのには不充分である．それで著者は Insulin の原料として魚体よりラ氏島を採取する立場から Insulin の製造の対象となり得る魚類についてラ氏島の生態を究めることにつとめた．

（1）魚体中に於けるラ氏島の位置

ラ氏島はすべての硬骨魚類に存在するものであるが魚種によりその位置を異にするのみならず，同一魚種でもその位置を発見するのに難易がある．

著者は産業的に重要な魚種について詳細な研究をなしその結果から次の如き結論に達した. 即ちいづれの魚種にてもラ氏島の位置は胆嚢の先端から腸に開口するまでの輸胆管及び胆嚢管の間に於てこれらに密着して存在するか, 或はこれらから少し離れて腸間膜中に存在することである. ときには肝臓中に或は脾臓中に半ば埋もれていることもあるが, その場合でもラ氏島は胆嚢管か腸間膜に附着しているもので決してこれらから飛び離れたところに存在するものではない.

（2）ラ氏島の分布状態

硬骨魚類のラ氏島には主島と副島とがある. 主島は概ね1個で大きさも大きいが副島は数個あつて主島の附近に散在し, 大きさは小さく肉眼で直ぐ判断がつくものと, 容易に見分けにくいものと顕微鏡的のものとがある. カツヲ, タラ等には1個の明らかな主島とその附近に分散して存在する数多の副島とがあるが, メヌケ, フグ等に於ては主島が明らかでないものもある. 主島を缺く魚体では副島が割合に発達しているものである.

第1表. 魚類ラ氏島の生態.

魚種名	ラ氏島の位置	ラ氏島の状態			
		分布	色	形状	重量 g
タラ *Gadus macrocephalus*	胆嚢の先端	大きな主島と細かい副島	淡紅白色	半球形	0.02～0.12
スケトウダラ *Theragra chalcogramma*	胆嚢の先端	主島が割合小さく副島は肉眼で判然しないものが多い	淡紅白色	半球形	0.01～0.04
カツヲ *Katsuwonus vagans*	胆嚢管の中央附近にして肝臓及び脾臓が胆嚢管と附着せる部分	主島1個, 細かい副島数個	桃色	卵形	0.03～0.08
トラフグ *Spheroides rubripes*	輸胆管の附近にして腸間膜中	主島の外数個の副島, 又は主島がなくて大きな副島数個	白色	球形	0.02～0.08
ブリ *Seriola quinqueradiata*	輸胆管に附着して肝臓の内面幽門垂の基部	主島及び数個の副島	紅白色	楕円形	0.05～0.15
サンカウメヌケ *Sebastodes iracundus*	胆嚢の附近腸間膜中	主島及び数個の比較的大きな副島	白色	円形	0.03～0.10
マグロ *Thunnus orientalis*	胆嚢の附近腸間膜中	主島及び副島数個	白色	球形	0.20～0.50
ビンナガ *Germo germo*	胆嚢の上部	主島及び大きい副島	白色	楕円形	0.08～0.18
キハダ *Neothunnus macropterus*	胆嚢の上部	主島及び副島数個	白色	卵形	0.15～0.30
サバ *Scomber japonicus*	胆嚢管の中部	小さい主島1個と細かい副島数個	紅白色	円形	0.01～0.03
オヒヨウ *Hippoglossus stenolepis*	胆嚢の腹部	大きな主島と散在性の副島数個	淡紅白色	半球形	0.04～0.11
カレイ *Pleuronichthys cornutus*	胆嚢の腹部	主島1個副島は判然しない	淡紅白色	半球形	0.01～0.05

註　本表中の副島とは肉眼で見えるもの.
　　ラ氏島が緑色を呈するものがあるがそれは胆汁により汚染されたもので本来の色ではない.

（3）ラ氏島の形状及び色沢

魚類のラ氏島はひらたい小さな卵形及び球形のものが多い. 例えばカツヲ, ブリ等はひらたい卵形をなし, メヌケ, フグ類はひらたい球形, タラ, カレイは半球形である. 色はカツヲ, ブリは桃色, メヌケ, フグは白色, タラ, カレイは淡紅色である. 一般に肝臓或は脾臓附近にあるラ氏島はひらたい卵形で桃色, 腸間膜にあるものはひらたい球形, 胆嚢の先端にあるものは半球形で淡紅色である. ラ氏島（主島）の大きさは大体魚体の体重に比例し魚体の大なるもの程大きい. 重要魚類では大体 0.01～0.50 g である.

魚体よりラ氏島を採取する場合, 初めラ氏島の位置が充分理解されない間はその採取は非常に困難を感ずるものであるが, 上記の如きラ氏島の生態を十分に熟知さえすればたとえラ氏島が肝臓実質中に埋没していてもその採取は容易である. 副島は主島に比し極めて小さいからその採取は甚だ煩雑であるため主島以外は産業的には殆ど意味のないものである. Insulin の資源として利用性のあると思われる魚類について著者の調査したラ氏島の生態を表示すれば第1表の如くである.

II. 魚体の大きさとラ氏島との関係

魚体の大きさとラ氏島の大きさとの関係を知ることは生物学的に興味があると同時に Insulin の製造に於ても必要なことである. この問題について右田[5]がタラの体長とラ氏島の大きさとの関係を明らかにしているが, 体長をもつて魚体の大きさを表わすことは同一魚種でも季節により又産地により痩肥があるから決してよい方法とは言えないし一般にも用いられていない. 特に形態を異にする異種間の魚体の大きさを比較する場合は体長によるよりもむしろ体重をもつて表現するのが合理的でもあり一般的でもある.

（1）各種魚体の体重とラ氏島の重量との関係

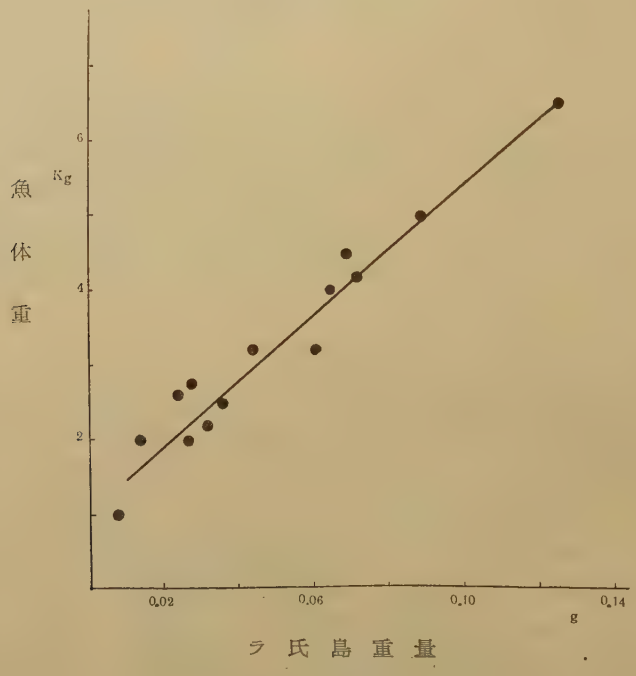
著者は産業的に重要な魚種について魚体の重さとラ氏島の重さとの関係を調べ第2表及

第 2 表. 魚類の体重とラ氏島の重量.

魚種		供試尾数	体重 kg	1尾平均体重 kg	1尾平均ラ氏島重量 g
タラ	大	50	5.0～8.8	6.5	0.135
	中	50	3.5～5.0	4.3	0.072
	小	50	2.0～3.5	2.6	0.028
スケトウダラ		50	2.3～4.0	3.0	0.025
カツヲ	大	100	4.0～6.0	5.1	0.089
	中	100	2.4～4.0	3.2	0.061
	小	100	1.2～2.4	1.6	0.031
ブリ		10	6.0～10.0	7.8	0.130
サゾカウメヌケ		250	2.0～3.0	2.6	0.033
ビンナガ		100	15.0～18.0	16.3	0.136
サバ		100	0.8～1.2	1.0	0.008
オヒヨウ		20	3.5～5.0	4.1	0.065
カレイ		100	1.5～2.5	1.7	0.012
トラフグ	大	110	4.0～5.0	4.4	0.068
	中	120	2.5～4.0	3.1	0.045
	小	100	1.5～2.5	1.8	0.027

び第1図の如き結果を得た.

この結果によれば特に大きな魚類或は特に小さい魚類を除けば，即ち大体 1.5～7.0 kg の魚類のラ氏島の重量は魚体重に比例し直線的な関係にある．而してラ氏島の重さと魚体重との割合は凡そ $1.0/10^5$～$2.0/10^5$ の間にある.



第1図.　魚体重とラ氏島重量との関係.

（2）鰹の体重とラ氏島の重量との関係

鰹は日本に於ては Insulin の最も重要な資源であるから，鰹の体重とラ氏島の重さとの関係を明らかにするため鮮度が同様で種々の大きさの鰹 145 尾を選びそれらの体重とラ氏島の重量を測定し，その結果からその頻度関係を求め第3表の如き結果を得た.

第3表によれば鰹の魚体の大なる程ラ氏島も亦大きくなることが明らかである．更に両者の相関係数 r を一般の方法[6] に従つて求めたところ $r=+0.82$ となり，明らかな順相関である.

（3）Insulin の原料としての魚体又はラ氏島の大きさ

魚体の大なるものはラ氏島が大きくて Insulin の含有量も多く魚体からの摘出も容易であるから Insulin の原料として有利である．これに反し魚体の小さいもの程ラ氏島が小さく且つ操作上種々の困難があり従つて事業的には極めて不利である．而して産業的見地からのラ氏島の大きさの限界は第2表に於て見られるように，2.0 kg 以下の魚体ではラ氏島の重量は 0.02 g 以下で魚体からの採取は困難であるから，大体 2 kg 以上の魚類を選ぶべきである．又主島以外のラ氏島は一般に極めて小さいから現在のところ Insulin の原料と

第 3 表.　鰹の体重とラ氏島重量との頻度関係.

ラ氏島重量 (g)	魚体重 (kg) 1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3	3.6	3.9	4.2	4.5	4.8	5.1	5.4	5.7	6.0	合計
0.01	1			1		1											3
0.02		1	1	2	2		1	1									8
0.03		1	3	4	3	3	1	2		1							18
0.04			2	2	6	4	4	1	2		1	1					23
0.05				1	1	3	3	7	6	6	2	3	1		1		34
0.06						1	3	3	4	3	2		2	1			19
0.07								1	1	2	3	5	1	2			15
0.08											1		2	3	1	1	8
0.09										1		1	2	1	1		6
0.10														1	3	2	6
0.11													1		1	1	3
0.12														1			1
0.13																1	1
0.14																	
0.15																	
合計	1	2	6	10	12	12	12	15	13	13	9	10	9	9	7	5	145

しては殆ど意味がない.

摘　要

硬骨魚類のラ氏島について生物学的観察を行い次の如き結果を得た.

（1）　ラ氏島の位置はどの魚類でも胆嚢の先端から輸胆管が腸に開口するまでの間に於て，胆嚢壁又は輸胆管に接しているか或は腸間膜中に在つても輸胆管からあまり遠くないところにある.

（2）　ラ氏島には主島と副島とがある．形状は卵形又は球形を呈し，色は淡紅色又は白色である.

（3）　ラ氏島の重量と魚体重との割合は大凡 $1.0/10^5 \sim 2.0/10^5$ の間にある．又両者の相関係数は $r=+0.82$ である.

文　献

1）　大沢岳太郎：日新医学，**5**，279 (1915).
2）　鵜飼　哲：東北医学雑誌，**9**，37 (1926).
3）　末広恭雄：水産試験場報告，**11**，112 (1941).
4）　遠山・鉄本・福屋・山田：日本農芸化学会誌，**17**，11 (1941).
5）　右田正男：水産試験場報告，**13**，1 (1943).
6）　長沢武雄：計算法（昭和6年).

Summary

The biological observations were done on the Islets of Langerhans of the Teleostei and the results are as follows.

1) In the Teleostei, the islets are found around the gall bladder or along the bile duct, sometimes in the mesentery not far from the duct.

2) With a large principal islet there are some small dispersed islets.

3) The shape of the islet is oval or spherical, the colour is pink or white.

4) The ratio of the weight of the principal islet to the weight of the fish body lies in $1.0/10^5 \sim 2.0/10^5$ and the correlation coefficient between them is $\gamma = +0.82$.

インシュリン資源としての魚類の
ランゲルハンス氏島に関する研究. II

魚類ランゲルハンス氏島のインシュリン含有量について

立　野　新　光

Studies on the Islets of Langerhans of fishes as a source of insulin. II

Insulin content in the Islets of Langerhans of fishes

Shinko Tachino

九州大学農学部学芸雑誌，第14巻　第2号，別刷，昭和28年9月28日

Reprinted from the Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol. 14, no. 2, September 28, 1953

インシュリン資源としての魚類の ランゲルハンス氏島に関する研究. II

魚類ランゲルハンス氏島のインシュリン含有量について

立 野 新 光

Studies on the Islets of Langerhans of fishes as a source of insulin. II

Insulin content in the Islets of Langerhans of fishes

Shinko Tachino

Insulin の原料として産業的に最も重要なことはラ氏島中に含有せられる Insulin の量である. この問題については 1924 年 McCormic[1,2] が Codfish (*Gadus callorius*) について研究しラ氏島 1g より 20～25 KIE* の Insulin を得たと報告しているし, McCormick and Noble[3] は Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) につき, Macleod[4] は Common flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) について研究しそれぞれ 28.3 KIE, 60～80 KIE を得, 同年 Dudley[5] も独特の方法により Codfish より 40 KLE を得ている. 又 McCormick and Noble[3] は Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), Pollack (*Pollachius virens*) のラ氏島 1g から 18 KIE, 35～40 KIE の Insulin を抽出している. 日本に於ては 1940 年頃から魚類の Insulin の研究が行はれ緒方・長沢[6] はタラ, スケトウダラのラ氏島 1g より 9.5 E†, 8.0 E を得, 遠山等[7] は日本産魚類 8 種類の Insulin 含有量を測定し, ビンナガ 70～193 IE**, キハダ 172 IE, メバチ 136 IE, カツヲ 109～129 IE, サンカウメヌケ 194 IE, タラ 153 IE, ブリ 126 IE, サバ 97 IE と報告している. その後長沢・近藤[8] は 11 種の魚類について研究しトラフグ 218 IE, サバ 76～139 IE, タラ 100 IE, キハダ 150～160 IE, ビンナガ 160 IE, カツヲ 6～137 IE, ブリ 147 IE, マダヒ 130 IE, マグロ 225 IE を抽出し, 右田[9] は千島産のタラよりラ氏島 1g につき 300 IE を得たと述べている.

以上の如く大型の重要魚類については やや広汎に亘つて研究されているが, その結果は同一種類についても 研究者によつて非常に相違していて 産業的立場から考えるときは全く迷わざるを得ない. その原因としては研究に用いた魚の新鮮度の相違, 魚体の大小の差によるものと思われるが, それ等の事項については全く記載がない. 又 Insulin の抽出方法, 力価の測定方法及び単位の表示方法も研究者 により或は研究の時代によつてかなり相違し

---

* 臨床単位. † 単位 (古い表示法).

** 国際単位 (現在は国際単位＝ＩＥで表示している).

ているので，今日迄の研究結果は正確な数値を示していないと言い得る．

それ故著者は信頼すべき結果を得るため，供試魚体の大きさを明らかにすることは勿論魚体の新鮮度には特に留意し，生きている魚体を用いるように努め，生きているものを得られない場合には死後直後で生きているものと殆ど同様の鮮度を保持しているものについて研究した．ラ氏島は主島のみを摘出し Insulin の製法は Dudley[5] の Acetone-picric 法を用い，Insulin の力価は Insulin *Lilly* を標準として Marks 法[10] によつて測定し単位は国際単位（Internationale-Einheit＝IE）を以て表示した．研究に用いた魚類は大型の魚体にて大量纏つて一時に漁獲され，その内臓は特定の場所で多量に蒐集し得るものであつた．即ち産業的見地から Insulin 製造の原料となり得る魚類ついて上記の方法により研究を行い第1表のような結果を得た．

第 1 表．　各種魚類のラ氏島の Insulin 含有量．

魚種名	供試尾数	体重	ラ氏島		Insulin			
			総重量	1尾当重量	粉末Insulinの収量	単位	ラ氏島1g当単位	1尾当単位
	尾	kg	g	g	mg	IE/mg	IE	IE
タラ 大	50	5.0～8.0	6.05	0.125	121.5	7.5	149	18.2
タラ 中	50	3.5～5.0	3.60	0.072	61.2	9.0	152	11.0
タラ 小	50	2.0～3.5	1.40	0.028	22.8	8.5	138	3.8
スケトウダラ	50	2.3～4.0	1.25	0.025	19.8	8.0	126	3.1
カツオ 大	100	4.0 6.0	8.90	0.089	125.1	9.5	133	11.8
カツオ 中	100	2.4～4.0	6.15	0.061	63.7	10.0	103	6.3
カツオ 小	100	1.2～2.4	3.10	0.031	36.0	9.0	104	3.2
トラフグ 大	110	3.2～5.0	6.38	0.058	68.0	10.0	106	6.1
トラフグ 中	120	1.5～3.2	4.44	0.037	45.2	10.0	101	3.7
トラフグ 小	100	0.8～1.5	2.50	0.025	27.0	10.0	108	2.7
ブリ	10	6.0～10.0	1.30	0.130	17.4	7.0	93	12.1
サンカウメヌケ	250	2.0～3.0	8.25	0.033	115.2	6.5	91	2.9
マグロ	40	200～350	15.32	0.383	238.0	11.0	171	65.5
ビンナガ	100	15～18	13.60	0.136	213.1	10.0	156	21.3
キハダ	30	25～50	5.52	0.184	74.2	10.0	134	24.7
サバ	100	0.8～1.2	0.80	0.008	9.3	5.5	63	0.5
オヒヨウ	20	3.0～5.0	0.13	0.065	18.9	8.0	116	7.5
カレイ	100	1.5～2.5	1.20	0.012	14.3	7.5	104	1.1

此の結果から考察するに，鮮度が同程度の場合は魚体の大きい魚種程1尾当りの Insulin の含有量が多い．即ち上記の試験に用いた中で最大の魚体であるマグロからは 1 尾当り 59.6 IE，中型の魚体であるカツオからは 11.8 IE，小型の魚体であるサバからは 0.5 IE の Insulin を抽出している．ラ氏島 1 g から得られる Insulin の量は魚体の大小によつて著しい相違はなく，サバの場合を除けば大体 100～170 IE である．

なお硬骨魚類のラ氏島 1 g 当りの Insulin の含有量が軟骨魚類及び哺乳動物の膵臓に比し如何に多いかを確認するための第2表の結果を示すこととする．

軟骨魚類は硬骨魚類と異り哺乳動物と同様の膵臓を有し島組織は Stannius 小体として分離していないから，軟骨魚類の膵臓を原料として Insulin を製造する場合には哺乳動物に於けると同様の方法によらなければならない．従つて Insulin の含有量も硬骨魚類のラ

第 2 表. 軟骨魚類及び哺乳動物の膵臓中の Insulin の含有量.

動物名	産地	膵臓 1 g 当単位 IE	研究者
ネズミザメ *Lamma cornubica*	八戸	2.0	著者
ヨシキリザメ *Prionace glauca*	八戸	1.5	著者
ホシザメ *Cynias manazo*	戸畑	5.0	著者
クジラ		2.5	長沢
牛 膵		2.5	長沢
豚 膵		2.5	高瀬
犢 膵		12.8	Scott, Fisher

氏島に比しその濃度は極めて低く，哺乳動物の膵臓と略ゝ同一程度で膵臓 1 g 中僅に 1.5～5.0 IE である．即ち軟骨魚類の膵臓及びその Insulin 含有量は牛豚の如き家畜と殆ど同様に見做して差し支えがない．

その他の研究では Redenbaugh 等[11]が鳥類の膵臓の Insulin の含有量を測定し，犢膵と同程度であると報告している．それ故に今日迄の研究では硬骨魚類のラ氏島は最も濃厚に Insulin を含有していることとなる．この事実は硬骨魚類のラ氏島が Insulin 原料として重要な意義を有することを明示するものである．

摘　要

日本産重要硬骨魚類の Insulin 含有量について出来るだけ正確に測定した．即ち各魚種について同一の鮮度のものよりラ氏島を摘出し，Dudley の方法により Insulin を抽出し，Marks 法によつて Insulin の力価を定めた．その結果ラ氏島の Insulin 含有量はラ氏島の重量に比例し魚種によつて著しい相違のない事を認めた．ラ氏島 1 g の Insulin の含有量は大凡 100～160 IE であつて，今日迄研究された動物の中で最も濃厚に Insulin を含有している．

文　献

1) McCormick, N. A. : Trans. Roy. Canad. Inst., 15 (1924).
2) McCormick, N. A. : Bull. Biol. Board Canada, (1924, Dec.).
3) McCormick, N. A. and E. C. Noble : J. Biol. Chem., **59**, Proc. XXIX (1924).
4) Macleod, J. J. R. : J. Metab. Res., **2**, 1 (1922).
5) Dudley, H. W. : Biochem. J., **18**, 665 (1924).
6) 緒方・長沢：臓器薬品化学，上巻，第5版（昭和15年）.
7) 遠山・鉄本・福屋・山田：日本農芸化学会誌，**17**, 11 (1941).
8) 長沢・近藤：薬学雑誌，**62**, 5 (1942).
9) 右田正男：水産試験場報告，**13**, 1 (1943).
10) Marks, H. P. : Biol. Stand., 1, 57.
11) Redenbaugh, H. E., Ivy, A. C. T. Koppanyi : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **23**, 756 (1926).

Summary

The insulin contents of the Islets of Langerhans of the staple Japanese fishes were estimated as strictly as possible by the method of Dudley on extraction of insulin and the method of Marks on standardisation of it.

The yields of the insulin extracted from the islets are in proportion to the weight of the islets, and do not vary with the species of fishes.

The insulin contents per gram of wet tissue of islet are about 100～160 IE and the islets of the Teleostei have the richest insulin contents of all the islets of animals ever researched.

インシュリン資源としての魚類の ランゲルハンス氏島に関する研究. III

魚体の鮮度低下がランゲルハンス氏島に及ぼす影響

立　野　新　光

Studies on the Islets of Langerhans of fishes as a source of insulin. III

The effect of the degradation of fish-body on the Islet of Langerhans

Shinko Tachino

九州大学農学部学芸雑誌, 第14巻　第2号, 別刷, 昭和28年9月28日

Reprinted from the Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol. 14, no. 2, September 28, 1953

インシュリン資源としての魚類の ランゲルハンス氏島に関する研究. III

魚体の鮮度低下がランゲルハンス氏島に及ぼす影響

立　野　新　光

Studies on the Islets of Langerhans of fishes as a source of insulin. III

The effect of the degradation of fish-body on the Islet of Langerhans

Shinko Tachino

牛豚の如き哺乳動物の膵臓を原料として Insulin を製造する場合には極めて新鮮な原料を用いなければならない. それ故に Scott and Parker 等[1]は屠殺当日午後3時迄の牛の膵臓を原料としている. それは温血動物に於ては膵臓組織が生活現象を停止した後は膵臓の外分泌物たる Trypsin により Insulin が破壊されるのみならず, 体温の影響により膵組織にも腐敗作用が起るからである.

ところが, 冷血動物たる魚類に於てはラ氏島は膵組織から孤立しているため Trypsin の作用を受けることがなく, 且一定の体温を持たないため, 魚類を低温下に置く時は相当長期間に亘つて Insulin は破壊されず且つラ氏島も腐敗することがなく貯蔵し得ることが想像される. この問題については右田[2]のタラに関する簡単な研究があるのみである。著者の多年の経験によれば魚体の鮮度とラ氏島との関係は魚類の種類によつて一様ではない。それ故に著者は寒流の底棲魚であるタラと暖海の回游魚であるカツヲとについて比較研究をなし, 又産業上重要な魚類について詳細な観察を行い下記のような結果を得た。

(1) 鱈についての試験

昭和 16 年 12 月青森に於て施行した. 供試材料は漁獲後未だ生きている 4 kg 内外の鱈 40 尾を選び, これを 10 尾づつ4群に分ち, その中1群は直にラ氏島を摘出した. 他の 30 尾は −3℃～+5℃ (夜間−3℃ 昼間+5℃) の室温に放置し1昼夜後 10 尾, 2昼夜後 10 尾, 3昼夜後残の 10 尾即ち1昼夜の間隔をおいて 10 尾づつを解剖して, 時日の経過に伴うラ氏島の変化並に内臓の状態を調査した.

その結果は第1表に示すように, 漁獲後 (死後) 1昼夜経過した鱈魚体中のラ氏島は漁獲直後のものに比し稍萎縮し 10 尾の中2尾のラ氏島は既に消失していた. ラ氏島の重量は1個平均 0.07 g, 全重量 (8個) は 0.56 g となり1昼夜の間に1個当 20 %, 全体として 30 %減少したことになる. 胆嚢壁は薄くなつて胆汁が表面に滲み出しラ氏島を淡緑色に染めているものもあつた.

第 1 表. 鱈魚体の時日経過に伴うラ氏島の変化（貯蔵温度 −3℃～+5℃).

漁獲後の経過日数	供試尾数	残存ラ氏島						消失ラ氏島		魚体鮮度
		個数	(%)	全重量(g)	(%)	1個の重量(g)	(%)	個数	(%)	(%)
漁獲直後	10	10	100	0.80	100	0.08	100	0	0	100
1 昼夜	10	8	80	0.56	70	0.07	87	2	20	90
2 〃	10	5	50	0.25	31	0.05	62	5	50	90
3 〃	10	1	10	0.03	3	0.03	37	9	90	80

漁獲後2昼夜を経過せるものの鱈のラ氏島は 10 尾の中5尾即ち 50% だけが残存しているが，その実質が軟化して島組織が破れ易くなり胆汁にて汚染せるものが多い．ラ氏島1個の重量は 0.05 g，全重量 0.25 g となり新鮮度 100% のものに比し，それぞれ 62 %，31% にしてその減耗率が極めて大きい．又この中には胆嚢が消失しているのもあつた．3昼夜放置せるものは胆嚢が消滅せるものが多く従つてラ氏島の残存せるものは10尾の中ただ1個のみであつた．然も残存せるものも全く萎縮軟化し僅にその形骸を止めるのみであつて Insulin 製造の原料とはならなかつた．

(2) 鰹についての試験

昭和 17 年 7 月石巻に於て試験を行つた．試料は 4 kg 内外の揃つたもの 50 尾づつを選んで5℃に冷蔵供試した．その結果は第2表の如くであつて，鰹は極めて貯蔵性に富み漁獲後3昼夜経過せるものでもラ氏島は50尾の中1個も消失していない．又ラ氏島1個当

第 2 表. 鰹魚体の時日経過に伴うラ氏島の変化（貯蔵温度 5℃).

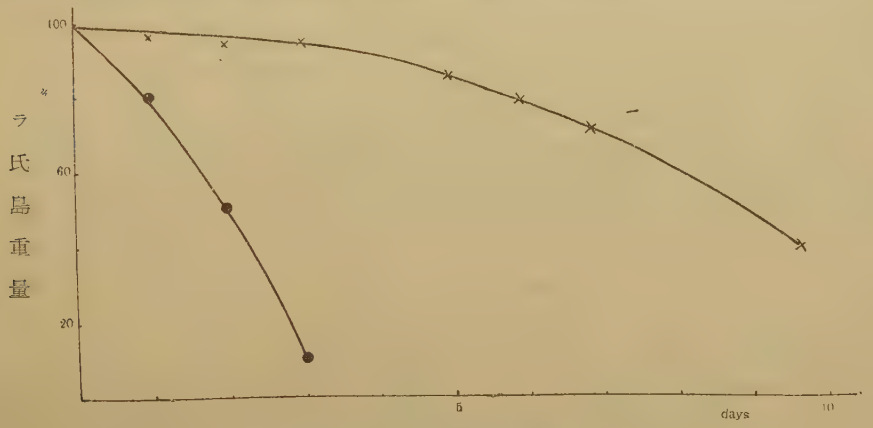
漁獲後の経過日数	供試尾数	残存ラ氏島						消失ラ氏島		魚体鮮度
		個数	(%)	全重量(g)	(%)	1個の重量(g)	(%)	個数	(%)	(%)
漁獲直後	50	50	100	3.30	100	0.066	100	0	0	100
1 昼夜	50	50	100	3.20	97	0.064	97	0	0	90
2 〃	50	48	96	3.10	94	0.065	98	2	4	80
3 〃	50	50	100	3.15	95	0.063	95	0	0	80
5 〃	40	49	98	2.94	89	0.060	91	1	2	70
6 〃	40	47	94	2.72	82	0.058	88	3	7	70
7 〃	50	48	96	2.68	81	0.056	85	2	4	60
10 〃	50	45	90	1.84	56	0.041	62	5	10	40

り及び全重量の減少率は鮮度 100 % のものに比しいづれも 5 % に過ぎず，ラ氏島の萎縮も起らず，色沢形状共に良好であつた．7昼夜冷蔵するも鰹魚体中のラ氏島はあまり変化することなく，消失せるラ氏島は供試 50 尾の中僅に2個，ラ氏島重量の減少は全重量に於て 19 %，1個当り 15 % であつた．魚体の鮮度は稍〻低下するも内臓及びラ氏島には殆ど変化が見られなかつた．10 昼夜冷蔵するに及んで魚体の鮮度がかなり低下し，ラ氏島重量の減少も全重量に於て 44 %，1個当り 38 %となり，形状も萎縮し色沢が黒色を帯び

て不良となつた.

(3) 鱈及び鰹のラ氏島についての考察

上記の実験結果を見るに鱈のラ氏島は−3°C～+5°C の寒冷な鱈魚体中に在りながらその萎縮消滅することが極めて速いのに反し，鰹のラ氏島は 5° C内外の鰹魚体中に於てかなり長期間の貯藏に堪える. 第1図の如く鱈は冬期に於ても 漁獲後1昼夜以上を経過せるものはラ氏島が相等萎縮して Insulin の原料としては最早役に立たぬが，鰹は夏季に於て貯藏方法さえよければ魚体の変化が緩漫で漁獲後1週間以上経過せるものでも Insulin の原料



第1図. 時日経過とラ氏島重量の減少率 (× 鰹 ● 鱈).

となり得るのである. この両魚種間に於けるかかる相違は生物化学的に 興味ある問題である. この理由として第一に考えられることは鱈は寒流の通る海底近くに棲息する魚類であり，鰹は暖流に乗つて回游する魚類であつて， 前者は 2°C を，後者は 22°C を適温として生活しているもので，両者間には生活条件として 20°C の温度差があることである. 従つて鱈の消化酵素は 2°C 内外で活潑に活動しているのに反し鰹の消化酵素は 5°C 以下ではその作用は殆ど停止状態にあるものと考えられる. このことは又鱈は 2 日間 0°C 内外の貯藏で魚体の外観が変化しないが内臓は崩壊の傾向を示し， 鰹は 7 日間 5°C 附近の貯藏でも内臓には殆ど異常が見られない事実からでも明らかである. 第二に考えられる ことは鱈と鰹とでは ラ氏島 の存在する 位置が相違することである. 鱈の ラ氏島は胆嚢の先端に密着しているため生活力を失つた胆嚢から 滲み出て来る酵素によつて 消化作用を受けるが鰹のラ氏島は胆嚢から離れているため酵素の作用を受けることがない. 右田も鱈のラ氏島の調査に於て鱈のラ氏島が 時日の経過と共に萎縮又は消失するのは 胆汁により消化されるのではないかと推察しているが， 著者の経験でも鱈のラ氏島が速に消失する理由は 確に胆汁の作用と思われる. 第三の理由は鱈の胆嚢膜は比較的薄くラ氏島を包む結締組織も柔軟であるが，鰹の胆嚢管壁は非常に強靱でありラ氏島もかなり厚い結締組織の被膜を有するため，鰹のラ氏島は 肝臓実質中に半ば埋もれていながらも 外部から消化酵素の影響を受けないも

のと思われる.

Insulin の原料として鱈, 鰹のラ氏島を考うるとき, 両者間のかかる相違は重大な問題である. 即ち第1図の如く漁獲後 ラ氏島の変化の甚だしい鱈の如きものはたとえ一時に多量漁獲せられ且つラ氏島の Insulin の濃度が高くとも, これを原料として Insulin を製造することはラ氏島蒐集の点で特別の方法を講じない限り非常な困難を伴うものである. 之に反し鰹のラ氏島の如く変化の緩漫なものでは Insulin 製造の計画がたつのである.

(4) その他の魚類のラ氏島

鰹, 鱈以外の一時に多量漁獲される魚類についても著者は機会ある毎に調査研究を続けて来たがその結果から次のことが言い得られる. 即ち一般に胆嚢に接近しているラ氏島程時日の経過による変化が大きく胆嚢から遠ざかるにつれて安定度を増す. たとえば鰤の如きは冬期に於ても漁獲された翌日既にラ氏島が崩壊せるものが多い. ヒラメ科の魚類のラ氏島もタラ科のラ氏島と同様に変化が甚だしい. 鮪, 鰤等の如く胆嚢とはあまり関係のない場所にあるラ氏島は 5°C 以下に貯蔵すれば数日間は殆ど変化しない. メヌケ, フグ等の腸間膜中に存在するラ氏島は鰹, 鮪程の保存性がないが鱈, ヒラメよりは遙に安定である.

摘 要

(1) 魚体の貯蔵中に於けるラ氏島の変化は魚種によつて異り, 鰹の如く暖流に乗つて回游する魚類はかなり長い期間冷蔵しても ラ氏島はあまり変化しないが, 鱈の如く寒流の海底に棲息している魚類は0°C内外に冷蔵しても内臓は速に溶解し従つてラ氏島は消失する.

(2) 胆嚢に附着して存在するラ氏島は被膜が薄く魚体を貯蔵している間に消失することが早いが, 腸間膜中に在るものは結締組織の強靱な被膜で覆われているため長期間の貯蔵に堪える.

文 献

1) Scott, D. A. and Parker : Trans. Roy. Soc. Canada, *Series* III, **26**, 311(1932).

2) 右田正男：水産試験場報告, **13**, 1(1943).

Summary

1) The degradation of the islets during the cold storage of fishes varies with the species of fishes. The islets of fishes, e. g. bonito, which migrate in warm currents are not easily degraded during the storage of fishes, while the islets of fishes, e. g. codfish, which live in cold water are destroyed even at 0°C.

2) The islet attached to the gall bladder has a weak membrane, so that it is easily crumbled away during the storage, while the islet found in the mesentery is always encapsulated with connective tissue and can be stored for a long time.

魚類インシュリンの研究

(第1報) インシュリンの抽出について

立野新光

Studies on the insulin of fishes. 1.
On the extraction of insulin from fishes

Shinko Tachino

九州大学農学部学芸雑誌，第14巻，第4号，別刷
REPRINTED FROM THE SCIENCE BULLETIN OF THE FACULTY
OF AGRICULTURE, KYUSHU UNIVERSITY,
VOL. 14, NO. 4, SEPTEMBER, 1954

魚類インシュリンの研究

（第1報）インシュリンの抽出について

立　野　新　光

Studies on the insulin of fishes. 1.
On the extraction of insulin from fishes

Shinko Tachino

I. 緒　　言

抽出はインシュリンの製造に於ける最も重要な工程であつて，その方法の良否，その巧拙はインシュリンの研究に於ては勿論，インシュリンの生産工業に於て基本的な重要性をもつものである．魚類のランゲルハンス氏島（以下ラ氏島と略記す）よりインシュリンの抽出については既往の文献によれば大体 3 つの方法に分類することができる．すなわち，（1）水溶液にて処理せるもの，（2）酸性アルコールを用いるもの，（3）ピクリン酸及びアセトンを使用せるもの等である．しかし以上の 3 つの方法の中で現在行われている方法は（2）及び（3）であるから，この 2 つの方法について検討を試み且つ著者の行つた研究について報告する．

II. 実験及び考察

1．酸性アルコール法及びアセトン・ピクリック法

1）酸性アルコール法　1922 年 Banting and Best[1] が含水アルコールを用いて家畜の膵臓よりインシュリンの抽出に成功し，更に彼等[2] は Collip の協力を得て酸性アルコールを用いトリプシンの作用を抑制して強力なインシュリンを抽出する方法を考察して以来，McCormick[3, 4, 5] はこの方法を Codfish, Pollack, Haddock 及び Halibut のラ氏島に応用してこれ等のラ氏島 1 g より 11.3～28.3 KIE* のインシュリンを抽出し，魚類のラ氏島は哺乳動物の膵臓に比し極めて濃厚にインシュリンを含有することを明らかにした．現在酸性アルコール抽出法には種々あるが，Best, Jephcott, Scott 法[6] が最も優れていると言われている．その方法は次の如くである．

摺潰した新鮮な原料 25 g に対してエタノール 75 cc, 水 25 cc, 濃塩酸 1.5 cc の割合から成る混液を加え 36°C の水浴中にて 2 時間暖めながら振盪して後濾過する．同様の操作をもう一度繰返して抽出を行い，濾液は合してアンモニヤで少しくアルカリ性となし生ず

* KIE＝臨床単位．

る沈澱を濾別し，濾液を pH 2 とし 35°C，減圧でエタノールを駆逐した後蒸溜水を加えて 250 cc とす．この溶液に全液の 15 % まで食塩を加えれば有効成分が析出する．これを濾別しアルコールとエーテルで洗つて乾燥する．

2）アセトン・ピクリック法　1923年 Dudley[7] がインシュリンの精製を目的としてこの方法を考案したのであるが 1924 年彼[5] は鱈のラ氏島にこの方法を直接応用し非常に効果的であることを認めた．同じ頃，Dodd and Dickens[9] もピクリック法を研究し，一般の蛋白質のピクリン酸塩は含水アルコール或は含水アセトンには殆ど溶解しないがインシュリンのピクリン酸塩は溶解することを発見した．かくて Dudley[8] は彼の考案したアセトン・ピクリック法を用いて Codfish のラ氏島 1 g より 40 KIE という当時に於ては他に類例のない好結果を得たのである．その方法は次の如くである．

鱈より摘出したラ氏島（試験に用いた鱈の尾数は 108 尾，ラ氏島の全重量は 9.6 g であつた）を飽和ピクリン酸液中に投入しピクリン酸を完全に島組織に浸透せしめた後ピクリン酸液から取り出し，これを細かく切つて乳鉢中に移し，ピクリン酸及びピクリン酸飽和溶液と少量の硅砂とを加えよく摺り潰し再びピクリン酸飽和溶液に返す．1 昼夜放置してピクリン酸液を濾し去り，細砕された島組織に少量の 75 % アセトンを加え乳鉢中にて磨細しながら抽出する．同様の操作を数回繰り返し完全に抽出を行う．抽出液は合して低温減圧にてアセトンを蒸発除去するとインシュリンのピクリン酸塩は脂肪と共に析出して来るから，これを集め遠心分離して溶液と分ち，この沈澱を純エタノール 75 分，3 N 塩酸 25 分の混液 5 cc に溶解せしめる．なお 5 cc の混液にてフラスコを洗滌し前の液に加え不溶解物質は遠心分離して除去し，上澄液を 200 cc の純アセトン中に注ぎ込む．インシュリンの塩酸塩は白色の沈澱として析出するから，これを濾し取りアセトンとエーテルにて洗滌して乾かす．塩酸塩として収量 0.126 g，ラ氏島 1 g に対し 40 KIE であつた．

上記の 2 方法は同時代の研究であるが，研究者が異つているのでいずれが優れた方法であるかは充分明らかでない．それで著者は鰹（*Katsuwonus vagans*）のラ氏島を原料とし 2 つの方法に従つてインシュリンの抽出を行い第 1 表のような結果を得た．但しこの試験に於て減圧でインシュリンを乾燥し，粉末インシュリンの力価の測定は Marks 法を用い，単位は国際単位（IE）で表示した．

第 1 表．　抽出方法を異にせる場合のインシュリンの収量．

供試ラ氏島		抽出方法	粉末インシュリン		インシュリンの収量		
個数（個）	重量（g）		収量（mg）	力価（IE/mg）	全収量（IE）	ラ氏島 1 個当（IE）	ラ氏島 1 g 当（IE）
100	5.5	酸性アルコール法	56.3	4.5	253.3	2.5	46.0
100	5.7	アセトン・ピクリック法	78.2	8.0	625.6	6.2	109.8

第1表の如く著者の研究によれば，魚類のラ氏島よりインシュリンを抽出する場合にはアセトン・ピクリック法（Dudley 氏法）は酸性アルコール法より遙かに優秀である．即ちインシュリンの全収量及び粉末インシュリンの力価はアセトン・ピクリック法は 625.6 IE，8.0 IE/mg であるが，酸性アルコール法は 253.3 IE，4.5 IE/mg であつて，ラ氏島 1 g 当

の収量は前者は後者の2倍以上である．抽出操作の上から言つてもDudley氏法は比較的簡単であるが酸性アルコール法の場合は食塩による塩析が困難で操作中に多量のインシュリンが逸脱するものと考えられる．遠山等[10]もDudley氏法をそのまま応用し鰹ラ氏島1gより109.00～136.10 IEのインシュリンを得ているし，長沢等[11]はDudley氏法を少し改良して鰹ラ氏島1gより137 IEを得ている．このように研究者によつてその結果に多少の相違はあるが，魚類のラ氏島よりのインシュリン抽出にはアセトン・ピクリック法が最も適当な方法と思われる．

2．ピクリン酸にて固定せるラ氏島よりインシュリンの抽出

ラ氏島は魚港に於て或は加工工場に於て魚体より摘出せられ，一般にピクリン酸漬として実験室に運ばれるのである．このピクリン酸にて固定されたラ氏島よりインシュリンの抽出については Dudley 氏法[7,8]の含水アセトンによる抽出以外には全然抽出法に関する研究はない．著者はメタノール，エタノール，アセトンを用い次の方法によりインシュリンのピクリン酸の抽出の研究を行い第2表の如き結果を得た．

実験方法　ピクリン酸溶液中に貯えられたラ氏島100個を採り，濾紙上に約10分間放置せる後秤量して乳鉢中に移し，硅砂1gと混じて摺り砕き，初め80％のメタノール（或はエタノール，アセトン）を用い攪拌して抽出を行い，遠心分離により抽出液を分ち，残渣には75％のメタノール（或はエタノール，アセトン）を注加し前回と同様抽出を行う．前後2回の抽出液は合して40° C減圧で，用いた抽出剤を駆逐せしめ，析出する沈澱は遠心分離して溶液と分ち，これにエタノール75分，1N塩酸25分から成る酸性混液20 ccを加えて沈澱を硝子棒で砕きつつ攪拌して出来るだけ溶解せしめ，不溶部分を遠心分離して除き上澄液は98％アセトン中に徐々に注入する．生ずるインシュリンの塩酸塩の白色沈澱は沈澱管に集め，遠心分離してアセトンと分ち，更にアセトン及びエーテルにて洗滌し減圧中にて乾燥する．

第2表．　抽出剤を異にせる場合のインシュリンの収量．

供試ラ氏島		抽出剤	酸性混液	沈澱剤	粉末インシュリン		インシュリンの収量		
個数（個）	重量（g）				収量（mg）	力価（IE/mg）	全収量（IE）	1尾当（IE）	ラ氏島1g当（IE）
100	4.3	メタノール	塩酸＋エタノール	アセトン	15.3	4.0	61.2	0.6	14.2
100	4.3	エタノール			57.2	10.0	572.0	5.7	133.0
100	4.1	アセトン			68.5	9.0	616.5	6.1	150.4

この実験に於て抽出せる溶液はメタノールは黄色，エタノールは赤褐色，アセトンは赤褐色を帯び，溶剤駆逐に際してはエタノールは泡を発生して困難を感じた．インシュリンの抽出量はアセトンが最も優れ，エタノールはアセトンに僅か劣るが，メタノールは1/10に過ぎない．得られた粉末インシュリンの力価はエタノール抽出がよく，アセトン抽出はやゝ低くメタノール抽出は非常に悪かつた．

アセトンがインシュリンのピクリン酸塩に対する抽出力の大なる理由は，元来アセトンは浸透性の強い上に油脂類をよく溶解するを以て，ラ氏島中の脂肪様物質を溶解し，これと共にインシュリンのピクリン酸塩を溶媒中に溶出せしめるものと思われる．一般に抽出後の抽出液の褐色の度の強いもの程インシュリンの抽出量が多い．それは黒褐色の物質はアセトンに溶解性の脂様物質である点から考えてこのことが言われるのである．之に反しエタノールは脂様物質を溶解する力がないのでインシュリンを随繞する脂様物質を溶解しないがインシュリンのピクリン酸塩を溶出する力が強い．従つてエタノールの抽出液はアセトンの場合より褐色の度合が遙に低く，その割合に抽出されるインシュリンの量が多く品質もよい．メタノールは脂様物質に対する溶解力がなく，インシュリンのピクリン酸を溶解する力も乏しいものと思われる．

3．インシュリンの沈澱剤

Banting, Best, Collip 等[12] は含水エタノールを用いて家畜の膵臓よりインシュリンを抽出した際，インシュリンを沈澱せしめるため一旦エタノールを駆逐して不純物を除去した後，これに 95 % になるまでエタノールを加えてインシュリンを沈澱せしめている．その後インシュリンは硫酸アンモニヤ或は食塩にて塩析されることが判明して以来，一般に塩析法にてインシュリンを析出せしめるようになつた．然し魚類ラ氏島より酸性アルコールにて抽出せる湿潤状態の粗インシュリンは，哺乳動物の膵臓より抽出せるものと異り，非常に吸湿性が強いため塩析は完全に行われず，塩析せるインシュリンは器壁に附着して操作が困難となるためその収量は極めて悪い．それ故に著者はメタノール，エタノール及びアセトンに対するインシュリンの沈澱状態を研究し第3表の如き結果を得た．

第 3 表．　沈澱剤を異にせる場合のインシュリンの収量．

供試ラ氏島		抽出剤	酸性混液	沈澱剤	粉末インシュリン		インシュリンの収量		
個数（個）	重量（g）				収量（mg）	力価（IE/mg）	全収量（IE）	1尾当（IE）	ラ氏島 1g 当り（IE）
100	4.6	75% アセトン	塩酸＋エタノール	98 % メタノール	42.5	6.5	276.2	2.7	60.0
100	4.4			98 % エタノール	—	—	—	—	—
100	4.3			98 % アセトン	78.4	9.0	705.6	7.0	16.4

上表によれば魚類の粗インシュリンはアセトンにてよく沈澱するがエタノールにては全く沈澱を起さない．沈澱剤の pH とインシュリンの溶解度との関係については Blatherwick 等，[13] Fenger and Wilson[14] の研究があるが，彼等が酸性ではインシュリンは 93 % のエタノールに完全に溶解すると述べているところをみると，この研究に於てインシュリンが 98 % のエタノールで沈澱しなかつたのは酸性混液中の塩酸のためと思われる．然しアセトンの場合は酸性でもよくインシュリンを沈澱せしめる．メタノールの場合はアセトンの場合の約 1/2 のインシュリンを沈澱させるが力価は遙に劣る．この結果から魚類インシュリン製造の際の沈澱剤としてはエタノールは全く使用不可能であり，メタノールも困難であつて，結局アセトンのみが優良な沈澱剤である．

4．酸　性　混　液

アセトンにて抽出したインシュリンのピリン酸塩を塩酸塩にするために用いる酸性混液としては Dudley[8] はエタノール 75 分と 3N 塩酸 25 分とから成る混液を用いているが，Charles and Scott[15] によれば 0.5～2N 塩酸酸性のエタノールではインシュリンの効果が破壊されると言うので，著者はアセトン 80 分，1N 塩酸 20 分の混液を用いることにより操作上及びインシュリンの収量の点で極めて良好な結果を得た．長沢等[11] は著者と同じくエタノールの代りにアセトンを用いることを推奨しているが，同氏の方法はアセトンと塩酸とを混合せず別々に加えるのである．Dudley のエタノール混液を用いるときはエタノールがインシュリンのピクリン酸塩中に夾雑している脂様物質に妨げられてインシュリンの溶解が完全に行われないし，長沢の如くアセトンと塩酸とを別々に加えるときは多量のアセトンを必要とするのみならず，生ずるインシュリン塩酸塩は不純物を含むことが多く，優良な製品を得ることは困難である．Dudley の混液と著者の混液を用いた場合の相違は第4表の如くである．

第 4 表．　酸性混液を異にせる場合のインシュリンの収量．

供試ラ氏島		酸性混液の種類	粉末インシュリン		インシュリンの収量			操作温度
個数（個）	重量（g）		収量（mg）	力価（IE/mg）	全収量（IE）	1尾当（IE）	ラ氏島1g当（IE）	（℃）
100	4.70	（Dudler）エタノール75分＋3N 塩酸 25 分	75.5	10	755.0	7.5	160.6	10～12
100	4.60	（著　者）アセトン 80 分＋1N 塩酸 20 分	73.0	11	803.0	8.0	174.0	10～12
100	4.52	〃　　〃	90.1	11	991.1	9.9	219.2	45

即ち Dudley のエタノール混液を用いるよりも著者のアセトン混液を用いる方が粉末インシュリンの収量が多いのみならず力価も高い．Dubley は常温でこの操作を行い，長沢等は低温を主張しているが，著者は上表の如くアセトン混液を加え 45°C に数分保ち，よく攪拌した方が操作上及び収量の点で好結果を得ている．なお混液のアセトン濃度が増加するにつれ，得られる粉末インシュリンの力価が上昇するけれども，収量は減少する傾向がある．

5．アセトンの濃度とインシュリンの抽出との関係

Dodd and Dickens[9] はアセトン・ピクリック法を用い家畜の膵臓よりインシュリンの抽出を研究し，膵臓のインシュリンのピクリン酸塩は 70% の含水アセトンに最もよく溶解すると報告している．魚類のラ氏島よりアセトン・ピクリック法にて抽出する場合，Dudley は試料の 15 倍量の 75% アセトンを，長沢等は試料の 6～40 倍量の 70% アセトンを使用しているが，抽出に適当な濃度については詳しい研究がない．著者は Dodd and Dickens に倣い魚類のラ氏島のインシュリンのピクリン酸塩はどの程度の濃度のアセトンで最もよく抽出されるかを研究し第5表の如き結果を得た．

第 5 表. アセトンの濃度とインシュリンの抽出量.

供試ラ氏島		アセトン(抽出液)の濃度(%)	粉末インシュリン			インシュリンの収量		
個数(個)	重量(g)		収量(mg)	ラ氏島に対し(%)	力価(IE/mg)	全収量(IE)	1尾当(IE)	ラ氏島 1g 当(IE)
100	4.1	50	45.7	1.11	6.0	274.2	2.7	66.8
100	4.2	60	70.7	1.68	8.2	580.0	5.8	134.8
100	4.4	70	75.1	1.70	9.0	675.9	6.7	153.6
100	4.3	80	62.6	1.45	10.5	657.3	6.5	152.8
100	4.0	90	56.3	1.40	11.0	619.3	6.1	154.7

即ち 50% のアセトンでは粉末インシュリンの抽出量は少くないが 60～70% で最も多い. アセトンの濃度が高くなるにつれて抽出液中の浮游物質が少くなり抽出液の分離が容易になる. 従つて抽出される粉末インシュリンの収量はアセトン 70% 以上ではアセトンの濃度が高くなるにつれて次第に減少するが力価は上昇する. 抽出に用いられるアセトンの濃度が 70% 以上 90% では抽出されるインシュリンそのものの量は大体に於て大差がない.

著者は以上の実験結果及びラ氏島の性質から考えて, ピクリン酸にて固定せるラ氏島に直に 75～80% のアセトンを注加するよりも, 初め 90% 以上のアセトンを加えて島組織の脂様物質及び附着せるピクリン酸を溶解せしめた後, 75～80% のアセトンにて処理する方が合理的であるとの考えの下に実験を行い, 第6表の如き良好な結果を得た.

第 6 表. インシュリン抽出の一新法.

抽出法	供試ラ氏島		アセトン(抽出剤)の濃度(%)	粉末インシュリン		インシュリンの収量		
	個数(個)	重量(g)		収量(mg)	力価(IE/mg)	全収量(IE)	1尾当(IE)	ラ氏島1g当(IE)
著者の方法(一新法)	100	48.7	第1回抽出 98	761.4	11	10358.1	10.8	222.9
			第2回抽出 75	225.7				
Dudley の方法(対照)	100	51.6	第1回抽出 75	732.6	10	8706.0	8.7	168.7
			第2回抽出 75	138.0				

即ち著者の方法はラ氏島 1g 当りの収量に於ても, 粉末インシュリンの品位についても Dudley の方法より優れている.

6. 抽出温度

アセトンを用いラ氏島中のインシュリンのピクリン酸塩を抽出する際の温度については基礎的な研究が見当らない. 長沢等[11]は可及的低温を主張し, Dudley[8]は温度に関しては無関心であり, 遠山等[10]も常温で抽出しているが, 彼等は理論的根拠もなく, インシュリンは一般に熱に対して弱いものであるとの観念の下に取扱つている. しかしこの問題は

インシュリン製造に於て重要な意義を持つものであるから，著者は 80% のアセトンを用いピクリン酸に固定せるラ氏島より 20° C，30° C，40° C，60° C の温度に於て 10 分間抽出を行い第7表の如き結果を得た．

第 7 表．　抽出温度とインシュリンの収量．

抽出条件 (80%アセトン)		供試ラ氏島		粉末インシュリン		インシュリンの収量		
温度 (°C)	時間 (分)	個数 (個)	重量 (g)	収量 (mg)	力価 (IE/mg)	全収量 (IE)	1尾当 (IE)	ラ氏島 1 g 当 (IE)
20	10	100	4.1	64	10	640	6.4	156
30	〃	100	4.0	66	10	660	6.6	165
40	〃	100	3.9	78	10	780	7.8	200
50	〃	100	4.2	75	10	750	7.5	178
60	〃	100	4.0	51	5	255	2.5	63

即ち 80% アセトン，10 分間の加熱ではインシュリンのピクリン酸塩は 50° C までは加熱によつて破壊を受けることはないが 60° C の沸騰温度では 2/3 破壊される．40° C までは温度の上昇に伴いインシュリンの抽出量が多くなるのは，ラ氏島中には 30° C 以下ではアセトンにても溶解困難な脂様物質が存在しインシュリンの溶解を妨害しているが．加熱と共に溶解し易くなり従つてインシュリンはアセトンに移行するものと考えられる．然し 45° C 以上では微細な物質が抽出液中に多量浮游し，抽出液の分離に困難を感ずるのみならず，アセトン駆逐に際し発泡して操作が困難となる．それ故に 40° C 前後がインシュリンのピクリン酸塩を抽出するのに最適の温度である．

著者は更にエタノール及びアセトンを用い次の如き方法によつて温浸法を行い，温浸法が冷浸法に優ることを明らかにした．

実験（1）エタノールによる温浸法　　ピクリン酸飽和溶液中に貯蔵せるラ氏島 200 個を採り，乳鉢中にて硅砂 1 g と共によく摺り砕き，これを逆流冷却器を附した内容 500 cc の丸底フラスコに移し 80% エタノールを加え，湯煎中に攪拌しながら 40° C にて 20 分間抽出を行う．次に冷却前に遠心分離して抽出液は減圧，40° C にてエタノールを駆逐し，生ずるインシュリンの塩酸塩の沈澱を集めて遠心分離して溶液を棄て去り，これに純エタノール 80 分 1N 塩酸 20 分より成る混液を加えて硝子棒にて沈澱を砕きつつ攪拌して溶解せしめ，不溶部分は遠心分離して除き，上澄液を 500 cc の純アセトン中に注入する．

第 8 表．　抽出温度の相違によるインシュリンの収量(エタノール)．

抽出法	供試ラ氏島		抽出温度 (°C)	粉末インシュリン		インシュリンの収量		
	個数 (個)	重量 (g)		収量 (mg)	力価 (IE/mg)	全収量 (IE)	1尾当 (IE)	ラ氏島 1 g 当 (IE)
温浸	200	9.6	40～55	186.2	11.0	2048.2	10.2	213.3
冷浸	200	8.8	5～8	138.1	10.5	1450.0	7.2	164.7

インシュリンは白色の沈澱として析出するを以て，沈澱を集め遠心分離し，無水アセトンにて2回洗滌して後減圧乾燥を行う．別に対照試験として，8°C 以下にて同様の方法により抽出を行い第8表の如き結果を得た．

実験（2）アセトンによる温浸法　前記のラ氏島 400 個を採り，アセトンを用い実験（1）と同様の方法にて温浸と冷浸を行い第9表の如き結果を得た．

第 9 表.　抽出温度の相違によるインシュリンの収量（アセトン）.

抽出法	供試ラ氏島		抽出温度 (°C)	粉末インシュリン		インシュリンの収量		
	個数 (個)	重量 (g)		収量 (mg)	力価 (IE/mg)	全収量 (IE)	1尾当 (IE)	ラ氏島 1g 当 (IE)
温　浸	200	9.5	40～55	240.0	10.0	240.0	12.0	252.6
冷　浸	200	9.1	5～8	179.0	10.0	179.0	8.9	196.7

以上の実験結果からインシュリンのピクリン酸塩の抽出に於いては，抽出剤としてエタノール或はアセトンを用いる場合は温浸法が冷浸法に優るものである．

摘　要

1）魚類のラ氏島よりインシュリンを抽出する方法として現在行われている酸性アルコール法とアセトン・ピクリック法とについて検討した結果，アセトン・ピクリック法が優れていることを確認した．

2）ピクリン酸で固定したラ氏島よりインシュリンのピクリン酸塩を抽出するのには 80～90 % のアセトンが効果的であり，インシュリンの塩酸塩の沈澱剤としては 98 % のアセトンが好適であつた．

3）インシュリンをピクリン酸塩から塩酸塩に変化せしめるために用いる酸性混液は，アルコール 75 分，3N 塩酸 25 分から成る Dudley のものよりも，アセトン 80 分，1N 塩酸 20 分から成る著者の混液が，操作上からも，得られるインシュリンの収量及び品質からも優秀であつた．

4）インシュリンのピクリン酸塩の抽出およびインシュリンのピクリン酸塩から塩酸塩に変化せしめる際，40°C に加熱することがインシュリンの収量の点で非常に効果的であつた．

参 考 文 献

1) Banting, F. G. and C. H. Best: J. Lab. Clin. Med., 7, 464 (1922).
2) Banting, F. G. and C. H. Best: Trans. Roy. Soc. Canada, 16 (1922).
3) McCormick, N. A.: Trans. Roy. Canad. Inst., 15 (1924).
4) McCormick, N. A.: Bull. Biol. Board Canada, 1924 Dec.
5) McCormick, N. A. and E. C. Noble: J. Biol. Chem., 59, Proc. XXIX (1924).

6) Best, C. H., Jephcott, C. M. and D. A. Scott: Am. J. Physiol., **100**, 285 (1932).
7) Dudley, H. W.: Biochem. J., **17**, 376 (1923).
8) Dudley, H. W.: Biochem. J., **18**, 665 (1924).
9) Dodds, E. C. and Dickens: Brit. J. Exp. Path., **5**, 115 (1924).
10) 遠山，鉄本，福屋，山田：日本農芸化学会誌，**17**，11 (1941).
11) 長沢佳熊，近藤政次郎：薬学雑誌，**62**，5 (1942).
12) Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B. and J. J. R. Macleod: Trans. Roy. Canada, **16**, 1 (1922).
13) Blatherwick, N. R. *et al*: J. Biol. Chem., **72**, 51 (1927).
14) Fenger, F. and R. S. Wilson: J. Biol. Chem., **59**, 83 (1924).
15) Charles, A. F. and D. A. Scott: J. Biol. Chem., **92**, 289 (1931).

Summary

(1) The acid-alcohol process and the acetone-picric process have been used for the extraction of insulin from the Langerhans' islets of fishes. Of these two processes, the author found that the latter was more suitable.

(2) As the extracting medium of insulin-picate from the islet fixed with picric acid, 80～90% acetone was the most effectual, and as the precipitant of insulin-hydrochloride, 98% acetone was the most desirable.

(3) The author's acidic mixture, composed of 80 parts of acetone and 20 parts of 0.1N hydrochloric acid, gave higher potency of insulin and better yield of it than Dudley's mixture and also had the advantage of making the process easier and more rapid.

(4) The author had the best result by heating at 40°C both in the case of extracting insulin picrate from fish islets and in that of converting it to the hydrochloride.

魚類インシュリンの研究

（第2報）インシュリンの精製について

立野新光

Studies on the insulin of fishes. 2. On the purification of insulin

Shinko Tachino

九州大学農学部学芸雑誌，第14巻，第4号，別刷
REPRINTED FROM THE SCIENCE BULLETIN OF THE FACULTY OF AGRICULTURE, KYUSHU UNIVERSITY,
VOL. 14, NO. 4, SEPTEMBER, 1954

魚類インシュリンの研究

（第2報）インシュリンの精製について

立野新光

Studies on the insulin of fishes. 2.
On the purification of insulin

Shinko Tachino

I. 緒　　言

魚類のラ氏島よりインシュリンを製造するに当つては第1報の方法により，1 mg 当 8～10 IE の力価を有するインシュリン粉末が得られ，そのままでも臨床的に使用され得るが，なお種々の不純物を含有しているので良品を得るには更に精製しなければならない．

魚類より抽出製造した粗製インシュリンの精製については長沢の記載せるものを除いては他に全然文献がないが，家畜の膵臓より製造したインシュリンの精製については多くの研究がある．その理由は魚類のラ氏島よりは容易に比較的高単位のインシュリンが抽出されるが，家畜の膵臓からは低単位のものしか得られないので，これを臨床的に用いるためには精製によつて不純物を除去し力価を高めなければならないからである．魚類の粗製インシュリンと家畜の粗製インシュリンとでは含有している不純物に多少相違があるので，家畜インシュリンの精製法をそのまま魚類インシュリンの精製に応用することは種々の疑問があり未だ実験例がない．著者はその主なる方法について研究を行いその可否について検討を試みた．

家畜インシュリンの精製法に関しては一般に次の方法が用いられている．

（1）等電点沈澱法，（2）塩類として沈澱せしめる法，（3）有機溶剤による法，（4）燐酸緩衝液による法．

なおこれらの方法以外に Doisy, Somogyi, Shaffer[1] の塩析法，Jensen and Evans,[2] Blatherwick[3] の塩酸水溶液のみによる方法，Moloney and Findlay,[4] Dingomanse and Laqueur[5] の活性炭素による吸着法等があるが実用的価値がないので省略する．

II. 実験及び考察

1. 等電点沈澱法

インシュリンの等電点は Blatherwick,[3] Abel,[6] Wintersteiner,[7] の研究によれば溶液中に共存する不純物質によつて多少の差はあるが大体 pH 5.0 前後とされている．即ちイ

ンシュリンは pH 5 内外に於て他の不純物から別れて沈澱するものである．この性質を利用して Somogyi, Doisy, Shaffer[7] は等電点沈澱によるインシュリンの精製法を考案した．その方法は大略次の如くである．

50 mg の粗製インシュリンを N/10 醋酸 5～10 cc に溶解し，これに対応する苛性曹達量の 20% を加える．そうすると 1/5 中和された醋酸溶液は pH 4 内外となり，インシュリン蛋白質は溶解しているが酸性蛋白質の大部分は析出する．濾液に前の醋酸を丁度半分だけ中和するに要する苛性曹達を加えて 7/10 中和すると pH 5 内外となる．この酸度ではインシュリンは直ちに沈澱するが，なお 1～2 日間氷室に放置して沈澱を完全ならしめた後遠心分離して沈澱を分つ．

著者は鰹のラ氏島より抽出製造した粗製インシュリンすなわち 5 IE/mg，8 IE/mg，10 IE/mg のものをそれぞれ 0.5 g を用いて上記の等電点法により精製を行い第1表の如き結果を得た．即ち等電点法では力価はかなり上昇するが，試料の力価の如何にかかわらず直に同程度の高単位のものとはならず，5 IE/mg のものは 8.0 IE/mg に，8 IE/mg のものは 11 IE/mg にと言う如く，用いた試料の力価に応じてそれぞれの異つた単位に上昇する．従つて精製粉末インシュリンの収量 (g) は試料インシュリンの力価の高いもの程少ないが，インシュリンの全収量 (IE) は試料インシュリンの力価の低いもの程少くない．しかしこの方法で精製する場合は高単位の試料程インシュリンの損失が大きい．

第 1 表． 等電点沈澱法によるインシュリンの精製．

試料（粗インシュリン）				精製インシュリン						
試料番号	供試量 (g)	力価 (IE/mg)	供試総単位 (IE)	粉末全収量 (g)	試料に対する %	力価 (IE/mg)	試料に対する上昇率 (%)	インシュリン全収量 (IE)	試料に対する %	損失 (%)
1	0.5	5.0	2500	0.205	41.0	8.0	60.0	1640	65.6	34.4
2	0.5	8.0	4000	0.161	32.2	11.0	37.5	1771	44.2	55.8
3	0.5	10.0	5000	0.142	28.4	13.0	30.0	1846	35.8	63.2

2．塩類として沈澱せしめる方法

インシュリンはその構成分子として多くの塩基性アミノ酸を有するので，酸と結合して塩を作る．この性質を利用して特殊の酸を用いてインシュリンを塩類として沈澱せしめ，これと共存する不純物から分離する方法が多くの学者によつて考案されている．その中で Dudley and Starling[8] はピクリン酸を用い，Funk[9] はフラビアン酸を用い，Dickens[10] はトリクロール醋酸を用いて家畜インシュリンの精製を行い注目すべき成績を挙げている．

著者は Dudley and Starling のピクリン酸法に準拠して次の方法で魚類の粗製インシュリンの精製を試みた．

粗インシュリン 1 g を塩酸酸性 pH 3.0 の水 200 cc に溶解し，不溶物質は遠心分離して棄て去り，上澄液は N/10 NaOH にて pH 4.8 とし，これにピクリン酸飽和溶液 100 cc を加えてよく攪拌し，1～2 日間氷室中に静置する．生ずる黄色の沈澱は遠心分離して集めてビーカーに移し，水 30 cc 及び飽和ピクリン酸液 20 cc を加え次に N/10 Na_2CO_3 を

少量加えてよく攪拌すると透明あるいは半透明な褐色の溶液となる．これを遠心分離して浮游物質を除去し，水を加えて 50 cc に稀釈し，前に用いた N/10 Na_2CO_3 に相当する N/10 HCl を加えるとインシュリンのピクリン酸塩が直ちに沈澱する．この液にピクリン酸飽和溶液 200 cc を加え 1～2 日間静置後上澄液を棄て沈澱を集めて遠心分離し，0.1 % ピクリン酸水溶液にて NaCl がなくなるまでよく洗滌し，これにアセトン 80 分，1N HCl 20 分からなる酸性混液を加えて攪拌しながら溶解し，不溶部分は遠心分離して除去する．かくしてインシュリンのピクリン酸塩は塩酸塩となる，上澄液をアセトン 800 cc 中に徐々に注入しながらはげしく攪拌すると白色のインシュリンが沈澱する．沈澱を集めて遠心分離しアセトンにて洗滌後減圧乾燥する．

著者は力価 5 IE/mg. 8 IE/mg. 10 IE/mg の粗製魚類インシュリンをそれぞれ 1 g づつ秤取して上記の精製法を行い第 2 表の如き結果を得た．即ち 5 IE/mg の試料は精製の結果力価は上昇して 10 IE/mg となり，100 % の上昇率を示しインシュリンの全収量は 62.8 % である．8 IE/mg，10 IE/mg の試料も夫々 12 IE/mg，13 IE/mg となり，力価は上昇するが 5 IE/mg の試料に比し上昇率は少ない．然し精製操作によるインシュリンの損失は単位の高い試料程少く，5 IE/mg のものは 37.2 %，8 IE/mg のものは 28.5 %，10 IE/mg のものは 21.8 % である．以上は唯1回の精製である．Dudley and Starling はこのピクリン酸法によればインシュリンに含まれている不純物の 90 % までを除去し得ると主張しているが，著者は 12 IE/mg の試料を用い 3 回この操作を繰り返したが，16 IE/mg 以上には単位を高めることは出来なかつた．

第 2 表．　ピクリン酸法によるインシュリンの精製．

試料（粗インシュリン）				精製インシュリン					
試料番号	供試量（g）	力価（IE/mg）	供試総単位（IE）	粉末全収量（g）	試料に対する %	力価（IE/mg）	試料に対する上昇率（%）	インシュリン全収量（IE）	試料に対する %	インシュリンの損失（%）
1	1.0	5.0	5000	0.314	31.4	10	100	3140	62.8	37.2
2	1.0	8.0	8000	0.477	47.7	12	50	5724	71.5	28.5
3	1.0	10.0	10000	0.602	60.2	13	30	7826	78.2	21.8

3．有機溶剤による方法

Scott and Parker,[11]　Gerlough and Bates[12] は家畜の膵臓より抽出したインシュリンの含水稀薄エタノール溶液に無水エタノールを加え，その濃度を 90～92 % まで上げることによつてインシュリンを精製している．著者は鰹のラ氏島より抽出した粗製インシュリンを 50 % 含水エタノールに溶解し，これに無水エタノールを加えてエタノールの濃度を 95 % 以上に上げてもインシュリンの沈澱の生成を見なかつた．しかしアセトンにてはよく沈澱するので，アセトンの濃度を任意に変化せしめることによつてインシュリンの分別沈澱を行つたところ比較的良好な結果を得た．

実験（1）　8 IE/mg の粗インシュリン 2.0 g を塩酸酸性 pH 2.5 の 70 % アセトン 50 cc に溶解せしめ，不溶物質は遠心分離して除去し，その上澄液に pH 2.5 の 95 % ア

セトンを注加してアセトンの濃度を 75% となし，このとき生ずる沈澱は遠心分離して分ち無水アセトンにて洗滌後減圧乾燥する．上澄液には更に上記の 95% アセトンを加えて 80% とし，生ずる沈澱を分ちて前の如く処理する．かくの如くしてアセトンの濃度を pH 2.5 に於て 85%，90% となし，その度毎に生ずる沈澱を分別して，その沈澱の収量及び力価を測定し第3表の如き結果を得た．

第 3 表． アセトンによるインシュリンの精製（その1）．

試料（粗インシュリン）			アセトンの濃度区別 (%)	各区のインシュリン				
供試量 (g)	力価 (IE/mg)	供試総単位 (IE)		粉末インシュリンの収量 (g)	力価 (IE/mg)	全単位 (IE)		試料に対する %
2.0	8.0	16000	75	0.087	1	87	980	6.1
			80	0.446	2	893		
			85	0.524	11	5796	15089	94.3
			90	0.717	13	9320		

この結果によれば，アセトンの濃度の上昇するにつれインシュリンの沈澱が多くなり，90% アセトンにては概ね全部沈澱する．80% 以下にて沈澱するものは殆ど無効蛋白質であつて，75% アセトンにより沈澱するものの力価は 1 IE/mg，80% にて沈澱するものでも 2 IE/mg に過ぎない．インシュリンの大部分は 80% 以上のアセトンにて沈澱し，80～85 % では 11 IE/mg，85～90 % では 13 IE/mg の力価を有するインシュリンが沈澱する．従つて 80% 以下のアセトンにて沈澱するインシュリンは全試料の 6.0 %，80～90% のアセトンでは 94 % である．

実験（2） 8.0 IE/mg の粗インシュリン 1 g を採り，0.25 N HCl 酸性の 70% アセトン 50 cc に溶解せしめ，これに無水アセトン 35 cc を加えて 82～83 % となし，このとき生ずる沈澱を遠心分離し無水アセトンにて洗滌後減圧乾燥する．上澄液は 800 cc の 98% アセトンに注入してインシュリンを沈澱せしめる．このときのアセトンの濃度は約 96% となる．この白色沈澱を遠心分離して分ち前と同様に処理する．この前後 2 回の沈澱につきその収量と力価とを測定し第4表の如き結果を得た．

第 4 表． アセトンによるインシュリンの精製（その2）．

試料（粗インシュリン）			アセトンの濃度区別 (%)	各区のインシュリン				
供試量 (g)	力価 (IE/mg)	供試総単位 (IE)		粉末インシュリンの収量 (g)	力価 (IE/mg)	全単位 (IE)	力価上昇率 (%)	試料に対する %
1	8.0	8000	82～83	0.396	2.0	792		9.9
			96	0.583	12.0	6996	50	87.4

第4表によればアセトンの濃度が 82～83 % にてはインシュリンは殆んど沈澱することはなく，無効蛋白質に吸着されて僅かばかり沈澱するだけである．即ち，粗インシュリン

1 g の中，82～83 % アセトンにて力価 2.0 IE/mg の沈澱が 0.396 g 得られるが，この沈澱を再び 0.25 N HCl 酸性の 70 % アセトンに溶解して精製すれば 10 IE/mg 程度のインシュリン粉末が得られ結局 80 % 位のインシュリンが回収される．83 % 以上の微酸性アセトンに溶存しているものは無効蛋白質よりもインシュリンが多い．即ちこの溶液を 98 % のアセトンに注加してアセトンの濃度を 96 % とした場合に沈降するインシュリン粉末は 0.583 g，12 IE/mg であつて，この精製法では力価の上昇率は 50 %，得られるインシュリンの量は 6996 IE で，試料に用いた粗インシュリンの 87.4 % が精製インシュリンとして得られる．この精製法を2回以上繰り返して行つても 13～14 IE/mg 以上は著しい力価の上昇は認められないがインシュリンの損失は殆ど起らない．

4．燐酸緩衝液による方法

1926 年 Abel[13] がピリヂン法によつて初めてインシュリンの結晶を得たのであるが，その操作は複雑であり収量も極めて少なかつた．その後多くの研究者[14,15]によつてインシュリンの結晶法が研究されたが技術的に種々の困難があり結晶の析出も充分とは言えない．それ故に著者は直に結晶化を行わず，彼等の方法を改良して魚類のインシュリンの精製に応用し第5表の如き結果を得た．

実験　$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ の 16.75 g と KH_2PO_4 の 2.75 g とを 1000 cc の水に溶解し（pH 7.15），その 200 cc を 500 cc のビーカーに採り同容量の水を加えこれを N HCl で pH 2.3 とする．これに粗インシュリン 0.5 g を含む溶液 20 cc，次に 0.5 % 醋酸亜鉛 5 cc とを加える．この溶液を N NH_4OH にて pH 6.2 に調整する．このときインシュリンは少しく沈澱して来るが，そのまま 2～3 日氷室に静置して沈澱の析出を完全ならしめて後沈澱を遠心分離して分ち減圧にて乾燥する．

第 5 表．　燐酸緩衝液によるインシュリンの精製．

試料（粗インシュリン）				精製インシュリン					
番号	供試量（g）	力価（IE/mg）	供試総単位（IE）	粉末インシュリンの収量（g）	試料に対する %	力価（IE/mg）	上昇率（%）	インシュリンの全収量（IE）	試料に対する %
1	0.5	10.0	5000	0.201	40.2	14	40.0	2814	56.4
2	0.5	13.0	6500	0.148	29.6	18	38.4	2664	40.9

この実験に於て 10 IE/mg の試料は pH 6.2 に調節したとき多量の沈澱を生じたが，これは純粋なインシュリンの生成ではなく，無効蛋白質を多量に含んだものであつた．13 IE/mg のものは力価は 18 IE/mg まで上昇したが，インシュリンの収量は試料に対し 40 % で比較的少なかつた．

5．アセトンの濃度とインシュリンの沈澱の生成状態

魚類のラ氏島よりインシュリンを抽出し塩酸インシュリンとして最後にアセトンにて沈澱せしめる場合，アセトン中に含まれている水分がインシュリンの生成状態に種々の影響

を与えるものである．インシュリンは 90% 以上のアセトンにより殆ど完全に沈澱することは Dudley[16] や Dodds and Dickens[17] によつて明らかにされているが，90% 以上のアセトンでも含有する水分によつてインシュリンの生成に難易があり，沈澱の性質に相違があるものである．此の問題については未だ研究がないが，魚類のラ氏島よりインシュリンを製造する場合に於てこの問題は特に重要である．

それ故に著者は 12 IE/mg の精製魚類インシュリンを 0.25 N HCl 酸性 80% アセトン 10 cc 中に 1 g 含有するように溶解せしめ，予め 200 cc のフラスコに用意せる 99%，97%，95%，93%，のアセトン 200 cc 中に各々 10 cc づつを注加してそのときのインシュリンの沈澱生成状態について精査した．

第 6 表． アセトン中の水分とインシュリンの析出状態．

試験番号	アセトン		10% インシュリン溶液 (cc)	沈澱生成後のアセトンの濃度 (%)	インシュリンの沈澱状態		
	濃度 (%)	使用量 (cc)			粉末インシュリンの収量 (g)	色調及び状態	力価 (IE/mg)
1	99	200	10	98	0.992	白色軽微粉末	12
2	97	200	10	96	1.014	白色軽粉末	12
3	95	200	10	94	0.982	灰色軽粗粉末	12
4	93	200	10	92	0.945	褐色鈍重粉末	12

上表によればアセトン中の水分はインシュリンの力価には影響を及ぼさないがインシュリンの色沢，粉末状態に密接な関係がある．インシュリンの生成状態について略述すると大体次の如くである．

（1）99% のアセトンにインシュリン溶液を攪拌しながら注加するとインシュリンは白色の軽い微粒子となつて生成し，アセトン中に懸垂して容易に沈降しない．

（2）97% のアセトンの場合は生ずるインシュリンの粒子は前のときよりもやや大きく沈降は緩漫であるが，20～30 分で完全に沈澱する．

（3）95% のアセトンの場合は生ずる粒子は前の場合よりも大きく沈降は速で攪拌が不充分のときは器底に附着することがある．

（4）93% のアセトンの場合は生ずるインシュリンは粉末状とならず，絮状となり粘着性が強く器底及び器壁に附着し取扱困難である．

沈澱の色調はアセトン中の水分が少ないもの程良好である．水分が多くなるにつれ沈澱は褐色の度を増す．

かくの如くアセトン中の少量の水分がインシュリンの生成状態，色調及び組織に影響するのは，魚類のインシュリンはアセトン溶液中に於ては強い吸湿性があるためと思われる．それ故にアセトンをインシュリンの沈澱剤として用いる場合には 95% 以下のものはさけなければならない．無水のものもインシュリンの沈降が困難な場合があるので不便であり結局 98% 程度のアセトンが最も便利である．実際の操作に於てはアセトンの濃度が 98%，インシュリン注加後の濃度が 96% の場合が沈澱の生成に最適である．

摘　　要

インシュリンの精製法として（1）等電点沈澱法，（2）塩類として沈澱せしめる方法，（3）有機溶剤による方法，（4）燐酸緩衝液による方法の 4つの方法について研究した．その結果ある程度収量を犠牲にして高単位のインシュリンを得るためには，燐酸緩衝液による方法がよく，力価の上昇よりも収量に重点を置く場合は，有機溶剤による方法が適当であつた．

アセトン中に含有する少量の水分がインシュリンの沈澱生成に特殊な影響を与えるので，この問題について実験的研究を行つた結果 98% のアセトンがインシュリンの沈澱生成に理想的であつた．

参 考 文 献

1) Doisy, E. A., Somogyi, M. and P. A. Shaffer: J. Biol. Chem., **55**. Proc. XXXI (1923).
2) Jensen H. and E. A. Evans: Z. Physiol. Chem., **209**, 134 (1932).
3) Blatherwick, N. R. *et al*: J. Biol. Chem., **72**, 51 (1927).
4) Moloney, P.G. and D. M. Findlay: J. Biol. Chem., **57**, 359 (1923).
5) Dingemanse, E. and E. Laqueur: Arch. Neerland Physiol, **12**, 259 (1927).
6) Abel, J. G. *et al*: J. Pharm. Exp. Ther., **31**, 65 (1929).
7) Wintersteiner, O. and H. A. Abramson: J. Biol. Chem., **99**, 741 (1933).
8) Dudley, H. W. and W. W. Starling: Biochem. J., **18**, 147 (1924).
9) Funk, C.: Science, **63**, 401 (1926).
10) Dickens, F. *et al*: Biochem. J., **21**, 562 (1927).
11) Scott, D. A. and Parker: Trans. Roy. Soc., Canada III 26, V. 311 (1932).
12) Gerlough, T. D. and R. W. Bates: J. Pharm. Exp. Therap., **45**, 27 (1932).
13) Abel, J. J.: Proc. Nat. Acad. Sci., **12**, 132 (1926).
14) Scott, D. A.: Biochem. J., **28**, 1595 (1934).
15) Fisher, A. M. and D. A. Scott: Biochem. J., **29**, 1055 (1935).
16) Dudley, H. W.: Biochem. J., **18**, 665 (1924).
17) Dodds, E. C. and F. Dickens: Brit. J. Exp. Path., **5**, 115 (1924).

Summary

As the method of purifying insulin several processes have been proposed, such as (1) isoelectric precipitation process, (2) sodium hydrochloride precipitation process, (3) organic solvent process, (4) phosphate buffer process. Studying on these processes, the author found that phosphate buffer process produced the highest potent insulin, while the best yield of insulin was given by organic solvent process.

The water content of acetone used as the precipitant had certain influences upon the precipitation of insulin, 98% acetone being the most favourable.

アルカリ消化採油時における
エマルジョン形成の防止

北御門 学・田中晴夫
(九州大学農学部水産化学教室)

Studies on tbe Prevention of Emulsifing in Alkali-digestion Frocess

Manabu KITAMIKADO and Haruo TANAKA
Department of Fishery Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University

日本水産学会誌 第19巻 第12号 別 冊
昭和29年4月25日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 19 No. 12. 1954

アルカリ消化採油時における エマルジョン形成の防止

北御門 学・田中晴夫

(九州大学農学部水産化学教室)

Studies on the Prevention of Emulsifing in Alkali-digestion Process

Manabu KITAMIKADO and Haruo TANAKA

The liver protein and the soap produced by adding sodium hydroxide to free fatty acid act as the emulsifier in the alkali-digestion process. The formation of emulsion retards not only the extraction of vitamin A but also the recovery of liver oil.

Accordingly, in this paper the prevention of emulsifing has been considered after the studies of the colloidal property of the liver protein and formed soap.

When oil is separated from the solution containing protein soap and, the concentration of protein must be kept lower than 6%, that of soap than 9%, pH value of the solution than 9.5, and the temperature higher than 70°C.

In the case of the liver containing a great deal of protein and free fatty acid, the process of alkali-digestion will be more effectively carried out in 0.2 mol sodium chloride solution.

現在肝油採油法には原料に水及び苛性ソーダを添加，加熱して肝臓蛋白を分解し同時に遊離脂肪酸を石鹸として除去する"アルカリ消化法"[1] が採用されているが，肝臓蛋白及び生成石鹸等の作用により消化液はエマルジョン相となり易く，一度エマルジョンを形成するとその解消は極めて困難である。エマルジョン状態では肝臓蛋白は十分に消化されず，従つて含有ビタミンAのすべてを抽出することは不可能である。又エマルジョンの形成は必然的に中性脂肪の鹸化を促進する。その他種々の理由から採油時には出来るだけエマルジョンの形成を防止せねばならない。

アルカリ消化採油に当りエマルジョン形成に攪拌が一大要因となることは勿論であるが，乳化剤として作用するものは生成石鹸及び肝臓蛋白であるから石鹸及び蛋白水溶液のコロイド性を検する一方法として種々の条件に於けるそれ等の粘度を測定し，その結果からエマルジョン形成防止を検討した。

実験及び考察

1. 試料石鹸及び蛋白

試料石鹸としてはヤジ鮫 (*Carcharinus sp.*) 肝油から熟製法[2] によつて製作，精製した乾燥石鹸を用いた。その組成は第1表の如くである。

試料蛋白としてはヤジ鮫肝臓をチョッパーで細断後遠心分離して固型部を集め，2倍量のアセントを以て油脂及び水分を除去した。アセントで数回洗滌後アセトンとエーテルの当量混合液で洗滌，吸引濾過，乳鉢で擂潰後 100 メッシュの篩を通して得た粉末を十分に減圧乾燥して粗製肝臓蛋白を得た。

* 1954 年3月 29 日受理 (印刷費負担)

Tble 1. composition of soap

Composition of soap (%)			
Moisture	0	Free alkali	0
Free fatty acid	0	Bound fatty acid	84.6
Unsaponifiable matter	2.4	Glycerine etc.	3.1
Bound alkali	9.7		

2. 石鹸及び蛋白の濃度による粘度変化

種々の濃度の石鹸及び蛋白水溶液を作製し，60°C の恒温槽中でオストワルド粘度計を以て測定した値を相対粘度で表わすと第1図のようになる。但し蛋白溶液の粘度は pH が9になるまで苛性ソーダを添加，60°C に3時間放置後の値である。*

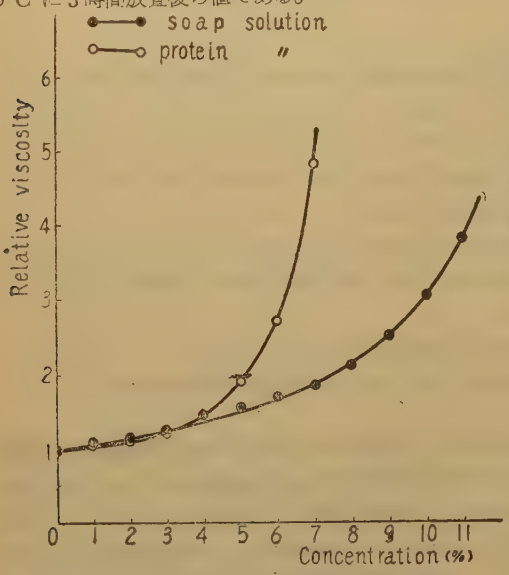


Fig. 1. Viscosity of soap and protein solution at 60°C

石鹸及び蛋白のような高分子化合物溶液は稀薄濃度では濃度と粘度とは直線的関係にあるが，ある濃度以上になるとこの関係は破れる。即ち肝臓蛋白は5～6%，石鹸は8～9%より濃度が増すと粘度は著しく増大する。それ故に実際の肝油の製造時には原料の蛋白量，生成石鹸量及び添加水量等を十分考慮して，蛋白及び石鹸量がこの粘度増大濃度を超過しないようにせねばならない。

3. pH による粘度変化

蛋白水溶液は濃度が5%以上になると粘度が著しく増大してその測定に誤差を生じ易いので3%及び5%のもの，石鹸水溶液は濃度が大なる方が測定し易いので5%，7%及び10%のものを用いた。各試料に濃厚苛性ソーダを滴加し，石鹸水溶液は 60°C になるのをまつて粘度を測定し，同時に水素ガス電極を用いて pH を測定した。蛋白水溶液は苛性ソーダを添加し 60°C に保つても第2図のように約 150 分を経過しなければ粘度が一定しないので 180 分後の粘度及び pH を測定した。

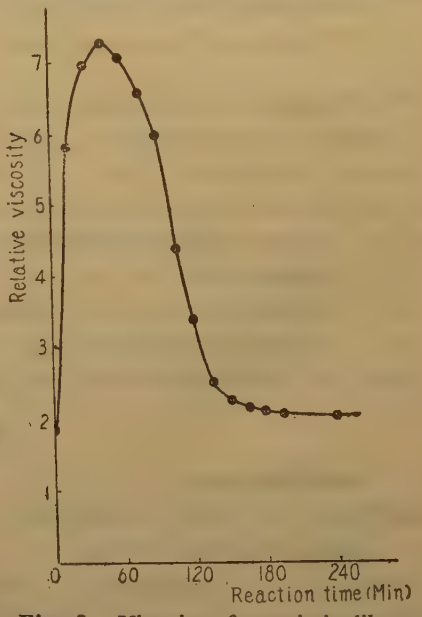


Fig. 2. Viscosity of protein in dilute NaOH solution at 60°C

第3図及び第4図に示すように石鹸水溶液は高濃度，低温度でない限り pH 11～12 の強アルカリ側で粘度変化を起すに過ぎないが，蛋白水溶液は pH が 9.5～10 より大となる

* アルカリ消化時の pH は9前後であり又次に示す如く粘度が一定となるのをまつて測定した。

と粘度を急激に増大する。

アルカリ消化採油時に添加苛性ソーダ量が過多となるとエマルジョンを形成し，肝油の収量が著しく悪くなるが，この原因は主として肝臓蛋白のコロイド性の変化に基くものと考えられる。故に採油時とくに肝油の浮上分離工程直前の pH は 8.5～9.5 で行うべきである。

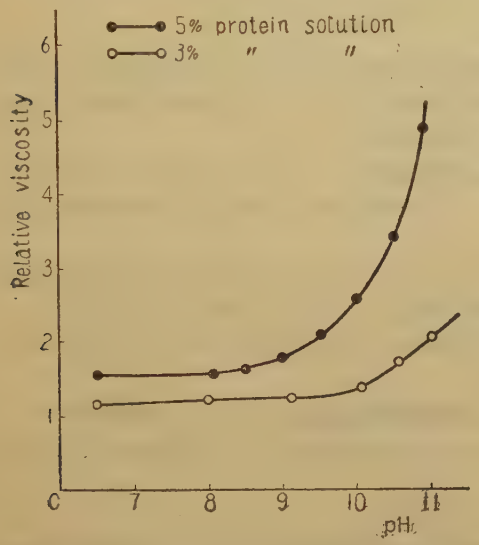


Fig. 3. Viscosity of protein solution at 60°C in relation to pH

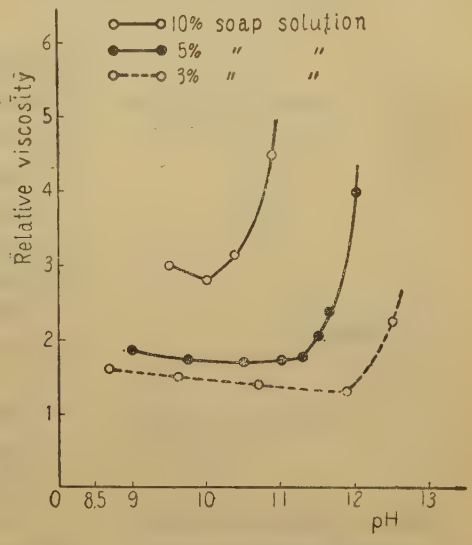


Fig. 4. Viscosity of soap solution at 60°C in relation to pH

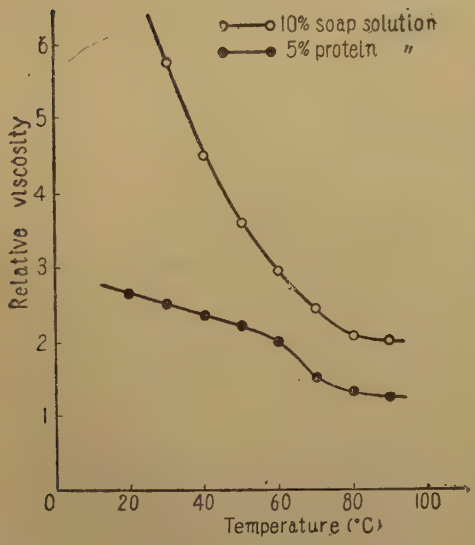


Fig. 5. Relation between viscosity and temperature

4. 温度による粘度変化

一般にコロイドの温度による粘度変化は高濃度の時に著しいので，5％の蛋白水溶液を pH 9.5 に調製したもの及び 10％ の石鹸水溶液を用いた。

第5図に示すように 70°C までの温度上昇につれて両溶液の粘度は急激に減少するが，それ以後は緩慢に減少するに過ぎない。

採油時には油脂分解酵素を破壊する意味からも一時高温にする必要があるが，この実験結果から考えても油を浮上分離させる時は勿論，湯洗等の精製は少くとも 70°C 以上で行わねばならない。

5. 中性塩による粘度変化

コロイドは中性塩によっても粘度を変化する。第6図に示すように両溶液ともある濃度までの食塩の添加によっては粘度を減少するが，それ以上の食塩濃度ではかえって増大し，とくに石鹸水溶液でこの関係が著しく表われている。食塩の濃度がある程度以上となると石鹸は塩析されて浮上する。

この関係を知るとアルカリ消化採油時に食塩を添

加することによつて良好な収量を得ることが出来る。例えばタラ肝臓の如く蛋白及び遊離脂肪酸を多量に含有するものでは 0.2～0.3 モルの食塩水中でアルカリ消化を行うとよい。又現在肝臓の輸送に当つて保存のために塩蔵しているものがあるが，あまり多量の食塩を添加した肝臓は採油が困難となり，油が分離浮上しない結果となるので注意すべきである。

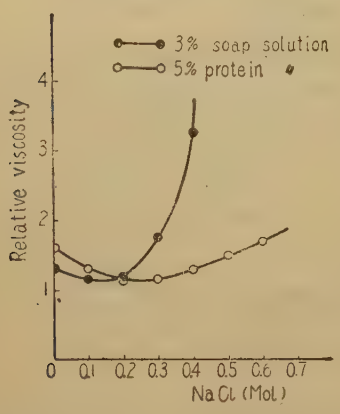


Fig. 6. Viscosty of soap and protein in NaOH solution

生に心から謝意を表する。

摘　　要

肝臓蛋白水溶液及び肝油から製作した石鹸水溶液の種々の条件における粘度変化を検討して，アルカリ消化採油時の最良条件を知ろうと試み次の結果を得た。

1) 採油に当り肝臓蛋白は5～6%，石鹸は8～9%以下の濃度になるように採油釜の容量，添加水量，原料肝臓量等を考慮せねばならない。

2) 採油時に pH が 9.5 以上となると肝臓蛋白水溶液の粘度が急激に増大するので 9.5 以下で採油せねばならない。

3) 肝油を浮上分離させる時の温度は 70°C 以上でなければならない。

4) 蛋白及び遊離脂肪酸を多量に含有している肝臓は0.2モルの食塩水中でアルカリ消化を行うと良好な結果を得ることが出来る。

終りに終始懇篤な御助言と御校訂をいただいた恩師立野新光先

文　　献

1) 森高次郎・渋井治平・河合豊昭：ビタミン 3, 170 (1950).
2) 中江大部："石鹸製造化学" (1950).

肝油の脱酸に就て

北御門 学・田中晴夫
（九州大学農学部水産化学教室）

On the Removing of F. F. A. of Liver. Oil

Manabu KITAMIKADO and Haruo TANAKA
Department of Fishery Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University

日本水産学会誌 第19巻 第12号 別 冊
昭和29年4月25日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 19 No. 12. 1954

肝油の脱酸に就て

北御門 学・田中晴夫
(九州大学農学部水産化学教室)

On the Removing of F.F.A. of Liver Oil

Manabu KITAMIKADO and Haruo TANAKA

The refined liver oil was obtained far lees by extracting the oil containing F.F.A. with ether and refining it with alkali than when the oil not containing F.F.A. was recovered by alkali digestion process. In the alkali digestion process the loss of refined oil seemed to be prevented by the existence of digested protein.

Accordingly, the author added the liver oil containing a great deal of F.F.A. to the fish liver digested with alkali, and obtained a most desirable recovery of refined oil.

採油法，貯蔵法等の関係で高酸価肝油が生ずることは稀ではないが，これらの不良肝油はビタミンAをそれ程破壊することなく含有しているものである。しかしながら肝油の脱酸の為に特別な方法は考案されておらず一般の油脂と同様アルカリ精製が行われている。肝油をアルカリ精製すると不鹸化物であるビタミンAは精製油中に残り，精製油のビタミンA濃度は増大すると考えられるが，実際には脱酸前と殆ど変らない。またこのとき精製油の収量は loss % と Acid valueとの比で表わすと 1.5 以上となり，十分な脱酸設備がない場合には 2.0～3.0 にも達する。

しかるにアルカリ消化法によつて肝油を採ると脱酸された油が得られるわけであるが，この場合の精製油の収量をアルカリ精製時の収量と比較すると両者の間に相当な開きが存在している。1例としてタラ肝臓 100gr からエーテル抽出によつて遊離脂肪酸をそのまゝ含有する肝油を採り，その後アルカリ精製を行つた場合と，アルカリ消化法によつて脱酸油を得た場合の収量を比較すると第1表の如くである。

Table 1. Recover of the cod liver oil

Precess	Extracted oil (gr)	Acid value	Oil refined with alkali (gr)
Ether extraction	41.64	34.6	20.03
Alkali-digestion			30.30

即ちアルカリ消化の際は loss%/Acid value は 0.77 で脱酸されているわけで，この比が 1.5 以上である普通アルカリ精製法と比較して非常に loss が少い。故に被脱酸肝油を移行油として肝臓のアルカリ消化時に添加すれば良好な収量を以て精製肝油が得られるのではないかと考えて実験を進め所期の結果を得た。

I. 脱酸方法

前報* の結果から蛋白，石鹸，油及び水の混合液から油を浮上分離するには

(1) 蛋白濃度は 4～5%以下であり，しかも十分消化されていなければならない。

1954 年1月 21 日受理 (印刷費負担)

* アルカリ消化採油時におけるエマルジョン形成の防止

(2) 石鹸濃度は5～6%以下でなければならない。
(3) pH は 9.5 以下でなければならない。
(4) 温度は 70°C 以上でなければならない。
という条件を知つたので次の方法によつた。

カツオ肝臓の所要量を 200 cc 容の蒸発皿に採り，これに肝臓分解に必要な苛性ソーダ及び被精油の脱酸に必要な苛性ソーダの和よりやゝ少量の 40% 苛性ソーダ溶液を添加し，少量の水を加えて徐々に加熱する。加熱分解 30 分後全量が約 100 cc となるまで水を加えた後 50gr の被精製油を添加する。pH が 9.0 となるまで苛性ソーダを補充し，攪拌しながら 10 分後に 80°C となるように加熱し続ける。脱酸終了後 300 cc の分液濾斗に移し熱湯を充満させて油を浮上させる。さらに湯洗を2回繰返してから遠心分離して収量を測定する。

Ⅱ. 実験結果及び考察

(1) Acid value 21.7 のタラ肝油

第2表に示す如く肝臓と被脱酸油が同量の場合に最も収量よく脱酸されており，loss%/Acid value は0.81である。

Table 2. Removing of F.F.A. of cod liver oil (A.V. 21.7)

No.	Liver of Skipjack(gr)	40% NaOH(cc)	Refined oil(gr)	Recovery (%)	Loss%/Acid value
1	0	2.50	32.00	64.00	1.66
2	5	3.55	34.35	68.70	1.45
3	10	4.70	35.88	71.76	1.31
4	20	6.70	38.21	76.42	1.09
5	30	8.40	39.70	79.40	0.95
6	40	10.50	40.84	81.68	0.84
7	50	13.00	41.22	82.44	0.81
8	60	15.00	40.10	80.02	0.85
9	70	17.00	39.64	79.28	0.95
10	90	21.50	14.00	28.00	3.36

この脱酸法によるとカツオ肝臓からも油が抽出され収量に関係するとも考えられるが，カツオ肝臓の含油量は約5%に過ぎずしかも Acid value は 100 を示したのでこれは脱酸時に殆ど石鹸として除去されるものとして計算した。

添加カツオ肝臓量があまり増大するとアルカリによる分解が容易でなく且つ粘度が増大し収量は著しく不良となる。

(2) Acid value 31.0 の工場回収油

第3表に示す如くこの場合も肝臓と被脱酸油が同量に近い場合が良好で loss%/Acid value は約 0.8 である。

(3) Acid value 67.01 の工場回収油

従来は Acid value が 30 を越すと先づ半量を脱酸した後残りの半量を加えて再び脱酸するという方法をとつた。しかしこのようにして Acid value 50 の油を脱酸し得たとしても loss%/Acid value は 2.0 近くなり精製油は殆ど得られない。

第4表に示す如くこの方法によると loss%/Acid value は 0.93 という非常に良好な収量で脱酸出来る。

（4） Acid value 11.12 のサメ肝油

Acid value が 10 位までは従来の方法でも比較的楽に脱酸出来るが，この方法でも第5表に示す如く少量の肝臓の添加で loss%/Acid value は 0.68 という非常に良好な収量が得られる。

Table 3. Removing of F.F.A. of high acid value oil recovered from the waste of cooker (A.V. 31.00) I

No.	Liver of Skipjack(gr)	40% NaOH(cc)	Recovery(%)	loss%/Acid value
1	0	3.5	29·8	1.30
2	5	4.6	31.3	1.21
3	20	8.5	34.7	0.99
4	30	10.0	36.4	0.83
5	40	13.5	36.8	0.85
6	50	14.0	37.6	0.80
7	60	17.5	37.9	0.78
8	70	18.5	33.6	0.88
9	90	21.0	29.8	1.06

Table 4. Removing of F.F.A. of high acid value oil recovered from the waste of cooker (A.V. 67.01) II

Liver of Skipjack(gr)	40%NaOH(cc)	Recovery(%)	loss%/Acid value
50	18.2	44.4	0.93

Table 5. Removing of F.F.A. of shark liver oil1

Liver of Skipjack(gr)	40%NaOH(cc)	Recovery(%)	loss%/Acid value
10	3.9	93.2	0.68

Ⅳ. 脱酸油の性質

（1） 色　　調： アルカリ精製は同時に脱色を伴うものであるがこの方法でも同程度の脱色は行われている。しかしカツオ肝油に特有な淡褐色が新に付着して来る。

（2） ビタミンA： 肝臓と被脱酸油が同量の場合に Acid value 22.3 の油で約 4,700 U.S.P.U/g の上昇があるが，これは殆どカツオ肝臓のビタミンAの抽出に由来するものと考えられる。

その他の性質はカツオ肝油に準ずる。

終りに終始懇篤な御指導をいただいた恩師立野新光先生に心から謝意を表する。

B. ZENITANI

A NEW SYSTEM OF CLASSIFICATION ON THE GENUS *DEBARYOMYCES* BASED ON ACID PRODUCTION

Reprinted from the Journal of the Faculty of Agriculture,
Kyūshū University, Vol. 10, No. 2, September 30, 1953

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 10, No. 2
September 30, 1951

A NEW SYSTEM OF CLASSIFICATION OF THE GENUS *DEBARYOMYCES* BASED ON ACID PRODUCTION

Buhei Zenitani

Yeasts belonging to the genus *Debaryomyces* play an important role in the preservation of food. They are different from other yeasts ecologically because of their wide distribution and high salt tolerance, and especially because of their common occurrence in brined, pickled, and other meat products.[1] On the other hand, they differ physiologically from the other true yeasts in the production of flavin pigment.[2] Although they are of much interest in this respect, their usefulness has not been recognized in the fermentation industry.

Among the taxonomic studies of *Debaryomyces*, which have hitherto been made, systems have been devised by Césari & Guilliermond (1920),[3] Konokotina & Krassilnikov (1929),[4] Stelling-Dekker (1931),[5] Lodder (1934),[6] and in the field of medicine, by Dodge (1935)[7]; and recently another new system was presented by Naganishi (1948).[8]

The ability of sugar-fermentation has been generally employed as an important key in classifying the true yeasts. But, the fermentation ability of all species belonging to *Debaryomyces*, with a few exceptions, is unstable and variable, as already pointed out by Naganishi (1940).[9] Therefore, the classification of *Debaryomyces* presented by Konokotina & Krassilinikov, Stelling-Dekker, Lodder, and Dodge, based on sugar-fermentation, cannot be considered applicable. Naganishi, in his system, while dividing *Debaryomyces* into "yellowish strain group"* and "non-yellowish strain group",

* The species belonging to this group produce a lemon-yellow pigment on the modified Hayduck medium and change the color of the medium to yellow, glimmering with green fluorescence, whereas the other group produces no yellow pigment on the same medium, and is generally fermentative.

did not employ the sugar-fermentation test for the identification of species in the former group.

As regards the specific characteristics of *Debaryomyces*, Zopf (1889)[10] reported the production of oxalic acid, and the same fact was demonstrated by Perwozwansky (1930).[11] The species used in their studies, *Saccharomyces Hansenii*, was amended to *Debaryomyces tyrocola* var. *Hansenii* (Zopf) Dekker. Naganishi (1940)[12] estimated the acidity of Koji water cultures using a large number of the species of this genus.

Taking these facts into consideration, the author investigated the ability of yeasts to produce acid from various kinds of sugar, and found it useful in the classification of *Debaryomyces*. The acid production test has been applied widely in the classification of bacteria, though never to that of true yeast. However, in the case of asporogenous yeast, the applicability of the test was ascertained by Castellani (1913),[13] who applied it to the genus *Monilia*; and Martin, et al. (1940),[14] to the genus *Candida*. Strong acid production by the genus *Brettanomyces* is also given considerable taxonomic weight by Custer (1940).[15]

In this paper, a new classification system of *Debaryomyces* based on acid production will be presented, together with the description, not only of its action on several sugars which have been previously tested in order to be employed for the identification of species or group, but also of the experimental conditions about "standard test" in detecting acid production.

Strains of *Debaryomyces* Used in the Experiment

Of the 31 strains used in this study, 18 were isolated and identified by the author, while undetermined strains are merely described as *Debaryomyces* sp. The yeasts that were tested, are listed in the following table.

Table 1. Strains of *Debaryomyces* used.

1. *Debaryomyces membranaefaciens* Naganishi.
2. *Debaryomyces membranaefaciens* var. *Zingiberi* Otani.
3. *Debaryomyces membranaefaciens* var. hollandicus Lodder.
4. *Debaryomyces* sp. C_2 (*D. membranaefaciens* type).
5. *Debaryomyces* sp. O_9 (*D. membranaefaciens*).
6. *Debaryomyces* sp. P_2 (*D. tyrocola* type).

7. *Debaryomyces japonicus* Naganishi.
8. *Debaryomyces* sp. C_4 (*D. tyrocola* type).
9. *Debaryomyces* sp. S_3 („ „).
10. *Debaryomyces* sp. C_1 („ „).
11. *Debaryomyces* sp. Q_3 („ „).
12. *Debaryomyces* sp. Q_4 („ „).
13. *Debaryomyces miso* Mogi.
14. *Debaryomyces miso* var. *α* Mogi.
15. *Debaryomyces* sp. Y_1.
16. *Debaryomyces Klöckeri* Guilliermond et Péju.
17. *Debaryomyces* sp. S_4 (*D. Klöckeri* type).
18. *Debaryomyces* sp. A_2 (*D. Matruchoti* type).
19. *Debaryomyces manchuricus* Naganishi.
20. *Debaryomyces globosus* Klöcker.
21. *Debaryomyces* sp. V_1.
22. *Debaryomyces* sp. X_3.
23. *Debaryomyces sake* Saito et Oda.
24. *Debaryomyces Matruchoti* Grigoraki et Péju.
25. *Debaryomyces* sp. S_2 (D. n. sp. unpublished)
26. *Mycoderma* sp. Q. Naganishi evaluated this yeast as *Debaryomyces*.
27. *Debaryomyces* sp. W_1.
28. *Debaryomyces tyrocola* var. *Hansenii* (Zopf) Dekker.
29. *Debaryomyces orientalis* Naganishi.
30. *Debaryomyces* sp. R_4.
31. *Debaryomyces Guilliermondii* var. *nova-zeelandicus* Lodder.

Action of *Debaryomyces* on Sugars

a) *Fermentation test*:—As shown in the classification of Stelling-Dekker and of Lodder, there are many species which have no fermentation ability. According to Naganishi (1940), they are found to have the ability, in the case of fresh yeast cells, and a number of notices have been given by him about the procedure of the fermentation test. The author has frequently experienced that, even with fresh cells, there occurs no fermentation, or, if it does, it is very erratic. Therefore, the fermentation reaction of *Debaryomyces* (excepting the fermentative group by Naganishi) is considered as insufficient for the basis of classification.

b) *Sugar-assimilation test*:—Lodder[16] has applied the assimilability of sugar as a key to classifying non-fermentative species, which belong to *Torulopsidaceae*, and furthermore, Diddens & Lodder (1942)[17] have extended its employment to all species of *Mycotoruloideae*. The author made an investigation to determine whether this test could be adopted as a key to classifying

Debaryomyces. Naganishi (1934)[18] studied the ability of sugar-assimilation with this genus, using the modified Hayduck's medium. The author repeated a similar test on some selected species using Lodder's medium. The basal medium consists of 0.5 % $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 % KH_2PO_4, 0.01 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. To this solution 2 % each of the test sugars were added. Each 5 cc. of the medium was inoculated with two drops of yeast suspension in sterilized water, and the cultures were examined after five and ten days at 25°C. The results are shown in Table 2.

Table 2. Sugar-assimilation test of several species.

Strains \ Sugar	glucose	fructose	mannose	galactose	sucrose	maltose	lactose	raffinose	xylose	arabinose	rhamnose
D. sake	+	+	++	++	++	++	−	+	+	++	−
D. miso	++	++	++	++	++	++	−	+	+	++	−
D. Klöckeri	+	+	+	++	+	++	−	+	+	++	−
D. orientalis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	−
D. japonicus	++	++	+	+	++	+	−	++	+	++	−
D. sp. R_4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
D. sp. C_2	++	++	++	++	++	++	−	+	+	++	−
D. sp. Q_3	+	+	+	+	+	+	−	+	+	++	−
D. sp. S_3	++	++	++	++	++	++	−	+	+	++	−
D. sp. C_1	++	+	++	++	++	++	−	+	+	+	−

No remarkable differences were found in their ability to assimilate the sugar, with the exception of lactose, although the test yeasts showed an obvious difference from ordinary yeasts in the case of pentose-assimilation. Thus, the sugar assimilability is considered to be of no significance in the taxonomy of this genus, with the exception that lactose-assimilation seems to be helpful in some cases.

c) *Acid production test*:—The test methed was established as follows:

On Acid Production of *Debaryomyces*

a) ***Relation between pH and acid production.***

In establishing the standard test by detecting acid-production,

it is necessary to know the relation between acidity and pH during the culture of *Debaryomyces*. Accordingly, the author experimented with typical species of this genus for acid-producing ability, fate, and pH change.

The test yeast: The fermentable species—*D. manchuricus* Naganishi and *D. globosus* Klöcker—and the unfermentable species—*D.* sp. P_2, *D.* sp. S_4, and *D. tyrocola* var. *Hansenii*—were used.

The experimental procedure: The basal medium was prepared as follows: 5% glucose, 0.25% peptone, and 1.0% NaCl were dissolved in distilled water, and the pH was adjusted at 7.0. 90 cc. of basal medium in a 100 cc. Erlenmeyer flask was inoculated with the test yeast, cultured on Sabouraud agar at 25°C for a few days, and allowed to stand at 25°C. The acidity of 5 or 10 cc. of the sample was estimated by titrating with 0.01N NaOH, using phenolphthalein as an indicator. The acidity is shown in the following table by the number of cc. of 0.1N NaOH necessary to neutralize the acid in 100 cc. of medium. The pH value was measured electrometrically.

The results obtained: Both of the fermentable species were strong acid producers. Acidity-curves distinguished them from the unfermentable species (Fig. 1), and a similar tendency was observed in the pH curves (Fig. 2). Among the species of each group, there

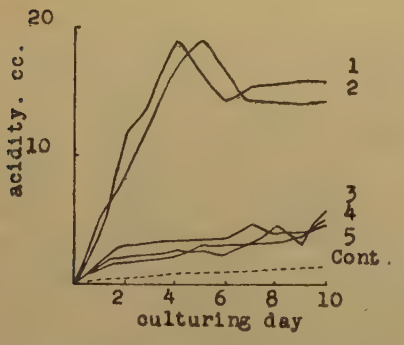


Figure 1. Change of acidity in the culture of some species of *Debaryomyces*.
1. *Debaryomyces globosus*.
2. *Debaryomyces manchuricus*.
3. *Debaryomyces* sp. S_4.
4. *Debaryomyces* sp. P_2.
5. *Debaryomyces tyrocola* var. *Hansenii*.

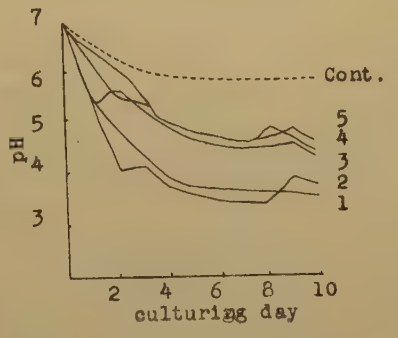


Figure 2. Change of pH by acid production of some species of *Debaryomyces*.

is little difference in acidity- and pH-curves. Since the pH value of the culture medium exhibits a tendency to decrease below a pH of 5.0 within 2–4 days, its degree of change will be available for the detection of acid production.

b) *Relation between the acid-producing ability and its pH in various concentrations of sugar.*

This experiment was carried out to decide a sugar concentration strong enough to have a distinct effect on the indicator, though most of *Debaryomyces* do not need as great a quantity of sugar as the alcohol yeasts as a source of energy.

The test yeast: Since the previous experiment showed no marked difference among the strains in each group, the following two typical species, *D. globosus* Klöcker and *D.* sp. C_2, were used.

The experimental procedure: The concentration of glucose solutions used, were 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, and 5.0%, respectively. All other conditions were the same as in the previous experiment.

The results obtained: *D. globosus* showed the maximum acidity within 2–4 days. The acidity then decreased gradually (Fig. 3), and the pH dropped below 5.0 (Fig. 4). In the case of *D.* sp. C_2, the acidity gradually increased, and the pH decreased independently of sugar concentration (Fig. 5). Hence, 0.5–2.0% sugar solution is considered to be adequate.

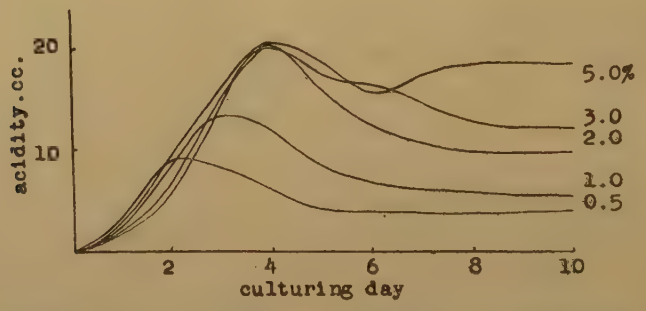


Figure 3. Change of acidity in the cultures of *D. globosus* with various concentrations of glucose.

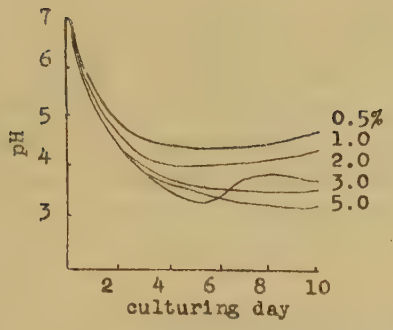


Figure 4. pH change in the cultures of *D. globosus* with various concentrations of glucose.

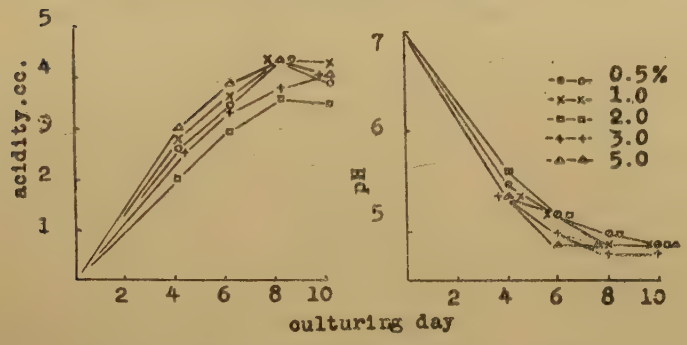


Figure 5. Changes of pH and acidity in the cultures of *D.* sp. C_2 (*D. membranaefaciens* type) with various concentrations of glucose.

c) *Establishment of standard test in acid production.*

Basal medium for standard test: Barsiekow's medium is usually used for the acid production test on bacteria, but it is unsuitable for the identification of yeast. The test medium for this purpose requires a suitable ratio between nitrogen and carbone; and addition of nutrient salts, such as phosphates, exhibits a tendency to delay acid production. Therefore, the basal medium was prepared as follows: 0.25 % peptone, 1.0 % NaCl, and 2 % test sugar were dissolved in distilled water, and 0.2 % Bromthymol blue solution was added to facilitate the judgment of acid production (12 cc. of the indicator to 1 liter of basal medium). The pH was then adjusted at 7.0. 3 to 4 cc. of the medium were placed in a small test tube and sterilized by ordinary procedure.

Experimental procedure: In general, American-type Sabouraud agar was used as the pre-culture medium. No difference from wort agar was perceived during the course of this experiment. During the incubation period, two day- and five day-cultures gave a consistent result with a slight difference in detecting-days. The results of comparison between the author's method with that of Martin (Table 3) showed that there was a tendency for delayed acid production in the Martin's method.

Table 3. Comparison of acid production test between Martin's method and the author's.

Strains / Sugars		*D. sake*						*D.* sp. R_4							*D.* sp. Q_3						
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7 days
Glucose	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	M	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+
Maltose	A	−	−	−	−	−	−	−	−	±	+	+	+	+	−	−	±	±	±	±	+
	M	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+
Sucrose	A	−	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	−	±	+	+	+	+	+
	M	−	−	±	±	+	+	−	−	±	+	+	+	+	−	−	±	+	+	+	+
Lactose	A	−	−	−	−	−	−	−	−	±	±	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−
	M	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	±	−	−	−	−	−	−	−

Note: A−The author's method, M−Martin's method.

Color and pH *change in basal medium*: In order to determine a color and pH change during the cultivation, the relation between them was observed on 0.25 % peptone water over a wide range of pH. The relations are as follows:

Color	pH	Degree of acidity
lemon yellow	below 5.4	##
slight greenish-yellow	ca. 5.4-5.5	#
light green	ca. 5.6-5.8	+
light blue	above 5.9	−

d) *Acid production test with various kinds of sugar.*

On 31 strains of this genus, the acid production test was carried out by the standard method, using glucose, maltose, sucrose, lactose, raffinose and galactose, with the following results (Table 4).

Table 4. The results of acid production test.

*	*D. tyrocola* var. *Hansenii* 1	2	3	4	5	6 day	*D. Guilliermondii* var. *nova-zeelandicus* 1	2	3	4	5	6	*D. orientalis* 1	2	3	4	5	6
D	−	++++	++++	++++	++++	++++	−	+	++++	++++	++++	++++	−	++++	++++	++++	++++	++++
M	−	−	−	++	++++	++++	−	−	−	++	++++	++++	−	−	−	++	++++	++++
S	−	+	++++	++++	++++	++++	−	+	++	++++	++++	++++	−	++	++++	++++	++++	++++
L	−	−	−	++	++	++	−	−	−	−	++	++	−	−	−	+	++	++
R	−	−	−	++	++	++	−	−	++	++++	++++	++++	−	−	−	−	+	++++
G	−	+	++	++	++++	++++	−	++	++++	++++	++++	++++	−	+	++	++++	++++	++++

	D. sp. R_4 1	2	3	4	5	6	*D. membranaefaciens* 1	2	3	4	5	6	*D. membranaefaciens* var. *Zingiberi* 1	2	3	4	5	6
D	−	+	++	++++	++++	++++	+	++++	++++	++++	++++	++++	−	++	++++	++++	++++	++++
M	−	−	−	+	++	++++	−	++++	++++	++++	++++	++++	−	−	+	++	++++	++++
S	−	+	++	++++	++++	++++	−	++++	++++	++++	++++	++++	−	−	+	++	++++	++++
L	−	−	+	+	++	++	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
R	−	−	+	++++	++++	++++	−	++++	++++	++++	++++	++++	−	−	−	−	+	++++
G	−	+	++	++++	++++	++++	−	++++	++++	++++	++++	++++	−	++	++++	++++	++++	++++

	D. membranaefaciens var. *hollandicus* 1	2	3	4	5	6	*D.* sp. O_9 1	2	3	4	5	6	*D.* sp. C_2 1	2	3	4	5	6
D	−	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++
M	−	−	+	++++	++++	++++	−	+	++++	++++	++++	++++	+	++	++++	++++	++++	++++
S	−	++++	++++	++++	++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	++++	++++	++++	++++
L	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
R	−	−	++	++++	++++	++++	+	++	++++	++++	++++	++++	−	+	++	++++	++++	++++
G	−	++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++

	D. miso 1	2	3	4	5	6	*D. miso* var. *α* 1	2	3	4	5	6	*D. japonica* 1	2	3	4	5	6
D	++	++++	++++	++++	++++	++++	−	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
M	−	+	+	++++	++++	++++	−	−	+	++	++++	++++	+	++	++++	++++	++++	++++
S	−	−	++++	++++	++++	++++	−	++	++++	++++	++++	++++	+	++	++++	++++	++++	++++
L	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
R	−	−	+	++++	++++	++++	−	−	+	++	++++	++++	−	+	++	++++	++++	++++
G	−	++	++++	++++	++++	++++	−	++	++++	++++	++++	++++	+	++++	++++	++++	++++	++++

	D. sp. C_1 1	2	3	4	5	6	*D.* sp. C_4 1	2	3	4	5	6	*D.* sp. S_3 1	2	3	4	5	6
D	+	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++
M	−	−	−	−	++	++++	−	−	+	+	++	++++	−	+	+	+	++	++++
S	+	++++	++++	++++	++++	++++	+	++++	++++	++++	++++	++++	−	+	++	++++	++++	++++
L	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
R	−	−	−	+	++	++++	−	−	+	+	++++	++++	−	−	+	+	++	++
G	+	++	++++	++++	++++	++++	+	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++

* Note: The test sugar.

D. – glucose S. – sucrose R. – raffinose

M. – maltose L. – lactose G. – galactose

D. sp. P_2

	1	2	3	4	5	6
D	++	++	++	++	++	++
M	+	+	++	++	++	++
S	++	++	++	++	++	++
L	−	−	−	−	−	−
R	+	++	++	++	++	++
G	+	++	++	++	++	++

D. sp Q_4

	1	2	3	4	5	6
D	++	++	++	++	++	++
M	−	+	+	+	++	++
S	−	−	++	++	++	++
L	−	−	−	−	−	−
R	−	−	−	−	+	+
G	++	++	++	++	++	++

D. Klöckeri

	1	2	3	4	5	6
D	++	++	++	++	++	++
M	−	−	−	−	++	++
S	+	++	++	++	++	++
L	−	−	−	−	−	−
R	−	−	−	−	+	++
G	++	++	++	++	++	++

D. sp. V_1

	1	2	3	4	5	6
D	−	−	+	+	++	++
M	−	−	−	−	+	++
S	−	−	+	++	++	++
L	−	−	−	−	−	−
R	−	−	−	−	−	−
G	+	+	+	+	++	++

D. sake

	1	2	3	4	5	6
D	−	++	++	++	++	++
M	−	−	−	−	−	−
S	−	−	−	++	++	++
L	−	−	−	−	−	−
R	−	−	−	−	−	−
G	−	+	++	++	++	++

D. sp. W_1

	1	2	3	4	5	6
D	−	+	++	++	++	++
M	−	−	−	−	−	−
S	−	−	−	−	−	−
L	−	−	−	−	−	−
R	−	−	−	−	−	−
G	−	−	−	+	++	++

D. sp. Y_1

	1	2	3	4	5	6
	+	++	++	++	++	++
	−	−	−	++	++	++
	−	++	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	−	−	−	−	+
	−	++	++	++	++	++

D. manchuricus

	1	2	3	4	5	6
	++	++	++	++	++	++
	−	−	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	−	++	++	++	++
	−	++	++	++	++	++

D. sp. S_4

	1	2	3	4	5	6
	++	++	++	++	++	++
	−	+	++	++	++	++
	+	+	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	+	++	++	++	++
	+	++	++	++	++	++

D. sp. X_3

	1	2	3	4	5	6
	+	++	++	++	++	++
	−	−	+	++	++	++
	−	+	+	+	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	−	−	−	−	+
	+	+	+	++	++	++

Mycoderma sp. Q

	1	2	3	4	5	6
	+	++	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	−	+	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	−	−	−	−	−
	−	−	+	+	+	+

D. sp. Q_3

	1	2	3	4	5	6
	++	++	++	++	++	++
	−	−	+	++	++	++
	−	−	+	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	−	−	+	+	+
	+	++	++	++	++	++

D. globosus

	1	2	3	4	5	6
	++	++	++	++	++	++
	−	−	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	++	++	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−

D. sp. A_2

	1	2	3	4	5	6
	++	++	++	++	++	++
	−	−	−	+	++	++
	−	+	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	−	+	++	++	++
	+	+	++	++	++	++

D. Matruchoti

	1	2	3	4	5	6
	−	++	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	−	−	−	−	+
	−	−	−	−	−	−
	−	−	−	−	−	+
	−	−	+	+	+	+

D. sp. S_2

	1	2	3	4	5	6
	+	++	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	+	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−
	−	+	++	++	++	++
	−	−	−	−	−	−

A NEW CLASSIFICATION SYSTEM FOR *DEBARYOMYCES*

The 31 strains tested can be divided into the following four groups, according to their ability to produce acid from sugar.

I. Acid from glucose, sucrose, maltose, and lactose .....4 strains.
II. Acid from glucose, sucrose, and maltose .....22 strains.
III. Acid from glucose and sucrose..... 4 strains.
IV. Acid from glucose ..... 1 strain.

Considering the results of the acid production test, using raffinose and galactose, and of the film formation test by Stelling-Dekker with the above groups, the author presents a new classification system for *Debaryomyces* as follows:

Group I. Acid from glucose, sucrose, maltose, and lactose.

Debaryomyces tyrocola var. *Hansenii* (Zopf) Dekker
D. Guilliermondii var. *nova-zeelandicus* Lodder
D. orientalis Naganishi
D. sp. R_4

Group II. Acid from glucose, sucrose, and maltose.

a) Film-formation on wort.
b) Greyish-white folded film.

D. membranaefaciens Naganishi
D. „ var. *Zingiberi* Otani
D. „ var. *hollandicus* Lodder
D. sp. O_9 (*D. membranaefaciens*)
D. sp. C_2 (*D. membranaefaciens* type)

bb) Grey thin film.
c) Acid from raffinose.

D. miso Mogi
D. miso var. *α* Mogi
D. japonicus Naganishi
D. sp. C_1 (*D. tyrocola* type)
D. sp. C_4 („ „)
D. sp. S_3 („ „)
D. sp. P_2 („ „)

cc) Acid from raffinose weakly.

D. sp. Y_1 (*D. tyrocola* type)
D. sp. Q_3 („ „)

D. sp. Q_4 („ „)

aa) No film on wort.

b) Gas and acid from glucose.

c) Acid from galactose.

D. manchuricus Naganishi

cc) No acid from galactose.

D. globosus Klöcker.

bb) No gas from glucose.

c) Acid from raffinose.

D. Klöckeri Guilliermond et Péju

D. sp. S_4 (*D. Klöckeri* type)

D. sp. A_2 (*D. Matruchoti* type)

cc) No, or less acid from raffinose.

D. sp. V_1

D. sp. X_1

Group III. Acid from glucose and sucrose.

a) Acid from galactose.

b) Acid from raffinose.

D. Matruchoti

bb) No acid from raffinose.

D. sake Saito et Oda

Mycoderma sp. Q

aa) No acid from galactose.

D. sp. S_2 (*D.* n. sp. unpublished)

Group IV. Acid from glucose.

D. sp. W_1

Discussion

The routine fermentation test is not of great singnificance in the case of *Debaryomyces*, but the acid production test is worthy of consideration as an important factor in differentiating the species of this genus. In employing this test it is necessary to decide the number of culturing-days required to judge the ability of acid production. Because of the following facts, the author considers it suitable to adopt the results of six culturing days:

1) In some rapid cases, acid production was observed within 24 hours, and it could be detected within 4–6 days even in the slow acid-producers; 2) when the test culture is allowed to incubate for a prolonged period, the color change becomes obscure; 3) a few species sometimes display a tendency to revert to the initial color after once changing; 4) the color of the medium itself may change during a long incubation.

As pointed out by a few workers, intermediate strains between *D. membranaefaciens* type and *D. Guilliermondii* type are very difficult to separate by the state of the film, whereas by the acid production from lactose, both types are easily distinguishable. *D. Guilliermondii* strain K, *D.* sp. H (*D. Guilliermondii* strain ?), *D. Guilliermondii* Dekker, and some of the other strains will probably be qualified for Group I, because Naganishi's test indicated that they were capable of assimilating lactose. This assimilability was exhibited by 4 of the 13 strains representing *D. tyrocola*, though by the author's test, all strains of this type that were tested were unable to produce acid from lactose and belonged to Group II.

This system is considered to be applicable for the taxonomy of *Pichia* and *Zygopichia*, having oxidative or weak fermentative ability, since the new system, based on acld production, gave simple and distinct diagnoses of *Debaryomyces*. It will become more useful by adopting the utilization test of nitrite and urethan (Naganishi 1948), and the growth test at moderate osmotic pressure (Wickerham 1951).

Summary

A standard test detecting the acid production for taxonomic studies of *Debaryomyces* was devised, and the acid-producing ability was investigated on 31 strains.

The yeasts tested, were divided into 4 groups, according to their ability of producing acid from glucose, maltose, sucrose, and lactose. Moreover, they were classified by the acid production test with raffinose and galactose, as well as by the state of the film. Thus a new classification system of *Debaryomyces* has been proposed.

Acknowledgment

This investigation was completed at the Chemical Laboratory of Aquatic Products, Faculty of Agriculture, Kyushu University, under the direction of Professor Yukio Tomiyasu. The author wishes to express sincere gratitude for his kind guidance during the course of the investigation.

References

1) Mrak, E. M. and Phaff, H. J.: Ann. Rev. Microbiol., II. 24 (1948).
2) Naganishi, K.: J. Ferment. Techn., **22**, 250 (1944).*
3) Cesari, E. P. et Guilliermond, A.: Ann. d. l'Inst. Pasteur, **34**, 229 (1920).
4) Konokotina, A. G. und Krassilinikow, U. A.: Woch. f. Brau., **49**, 335 (1920).
5) Stelling-Dekker, N. M.: Die sporogenen Hefen, Erste Hälfte (1931).
6) Lodder, J.: Zentral. Bakt., II, **86**, 251 (1932).
7) Dodge, C. W.: Medical Mycology (1935).
8) Naganishi, K.: J. Ferment. Techn., **26**, 345 (1948).*
9) Naganishi, K.: Jyozogaku Zasshi, **18**, 787 (1940).*
10) Zopf, H.: Bericht. d. deut. Bot. Gesel., **7**, 94 (1889).
11) Perwozwansky, W. W.: Zentral. Bakt., II, **81**, 372 (1930).
12) Naganishi, K.: Jyozogaku Zasshi, **18**, 726 (1940).*
13) Castellani, A. and Chalmers, A. J.: Mannual of Tropical Medicine, 2nd Ed., (1913). ibid. 3rd Ed. (1919) cited from 17).
14) Martin, D. S., John, C. P., Yao, K. F. and Lee, 1. E.: J. Bact., **34**, 99 (1937). Martin, D. S. and John, C. P.: J. Bact., **39**, 609 (1940).
15) Custer, M. Th. J.: Onderzoekingen over het gistgelacht Brettanomyces, Diss. Delft (1940) cited from Henrici, A. T.: Bact. Rev., **5**, 153 (1941).
16) Lodder, J.: Die anascosporogenen Hefen, Erste Hälfte (1934).
17) Diddens, H. A. und Lodder, J.: Die anascosporogenen Hefen, Zweite Hälfte (1942).
18) Naganishi, K.: Nippon Gakujutsu Kyokai Hōkoku, **10**, 772 (1934).*
19) Wickerham, L. J.: "Taxonomy of Yeast." Techn. Bull. No. 1029, p. 15, U. S. Dept. of Agric., Washington, D. C. (1951).

(The mark* indicates an essay which was published in Japanese).

水産醱酵食品の酵母に関する研究（第4報）

真性酵母菌の分類学的位置に就て

銭　谷　武　平

Yeasts occurring in fishery-fermentation products. Part 4
A taxonomic study of true yeasts

Buhei Zenitani

九州大学農学部学芸雑誌，第14巻　第2号，別刷，昭和28年9月28日

Reprinted from the Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol. 14, no. 2, September 28, 1953

水産醱酵食品の酵母に関する研究（第4報）

真性酵母菌の分類学的位置に就て

銭　谷　武　平

Yeasts occurring in fishery-fermentation products. Part 4
A taxonomic study of true yeasts

Buhei Zenitani

前に著者[1]は各種の塩辛類から多数の真正酵母菌を分離し，その生理学的性質が醤油・味噌酵母に類似すること，殊に味噌酵母の特性と共通することを指摘した．

本報に於ては前報迄の菌学的一般性質に基き分類学的位置を検討した塩辛酵母の種類，即ち既知酵母5種と新種並に新変種3種の分類と類縁関係などに就て報告する．

真性酵母菌の分類と類縁関係

I. 各種の塩辛から分離した眞性酵母の種類

Stelling-Dekker[2] (1931)及びLodder & van Rij[3] (1952)の分類によつて所属位置を決定した塩辛酵母の種名はTable 1 の如くであつて前者に従うと既知菌種11種と未知菌種5種

Table 1. The identified species of true yeasts isolated from "Shiokara".

By Stelling-Dekker (1931)	By Lodder & van Rij (1952)
Zygosaccharomyces Barker	*Saccharomyces* (Meyen) Reess
Z. soja Takahashi et Yukawa ····· $F_{1\text{-}2}$	*Saccharomces rouxii* Boutroux
Z. japonicus Takahashi et Yukawa ····· R_3	
Z. major var. *miso* Mogi ····· R_1	
Z. miso γ Mogi ····· N_1	
Z. sp. Q_2 ····· Q_2	
Z. sp. E_1 ····· E_1	···*Saccharomyces kyushuensis* n. sp.
Torulaspora Lindner	
Torulaspora sp. M_3 ····· M_3	···*Saccharomyces rouxii* Boutroux
Hansenula H. et P. Sydow	*Hansenula* H. et P. Sydow
H. javanica (Groenewege) Dekker ····· C_3	···*H. anomala* (Hansen) H. et P. Sydow
Debaryomyces Klöcker	*Debaryomyces* Lodder et van Rij nom. conserv.
D. tyrocola var. *hansenii* (Zopf) Dekker ··· R_4	*D. hansenii* (Zopf) Lodder et van Rij
D. guilliermondii Dekker ····· B_1	
D. membranaefaciens Naganishi ····· O_9	*D. nicotianae* Giovannozzi
D. tyrocola strain ····· $C_{1\text{-}4}$, $Q_{3\text{-}4}$, S_4, P_2	
D. sp. C_2 ····· C_2	···*D. nicotianae* var. *salsus* n. var.
D. kloeckeri Guilliermond et Péju ··· A_1, S_4	*D. kloeckeri* Guilliermond et Péju
D. matruchoti Grigoraki et Péju ····· A_2	
D. sp. S_2 ····· S_2	···*D. oviformis* n. sp.

となつたが後者に依る分類では既知菌種5種と新酵母3種となつて著しく減少した.

なお, 先にSkinner 等(1948)の分類によつて掲げられた属名[1]の内, *Zygosaccharomyces* Barker 及び *Torulaspora* Lindner の2属は Lodder & van Rij により *Saccharomyces* (Meyen) Reess に統合されたので, 前2属に所属した菌種は *Saccharomyces* 属に変更された.

II. 既知の酵母に該當する菌種の類縁関係

Lodder & van Rij は属の改廃を行つたのみならず多数の種の統合を行い, 例えば従来の醤油酵母等13種の耐圧性酵母を全部 *Saccharomyces rouxii* に統合した. 著者は統合前の個々の種との詳細な類縁関係を記載する煩雑さを避け, 予め著者が Stelling-Dekker の分類で決定した種類の種名をあげてこれに代えた. 又 Stelling-Dekker 以降に新種或は新変種として記録された種類の内には Lodder & van Rij の分類に未採録であつて当然, 整理・統合されるべきものもあるから, かような菌種との関係もなるべく簡略に記載した. なお, 同一種でも醗酵性糖類が両分類法で僅少の相違を示す場合もあつたが努めて近縁種をあげることにした.

Saccharomyces (Meyen) Reess

1) *Saccharomyces rouxii* Boutroux …… $F_{1\cdot2}$, $R_{1\cdot3}$, M_3, N_1, Q_2.

Saccharomyces rouxii は葡萄糖と麦芽糖を醗酵しその synonym として *Zygosaccharomyces soja, Z. major, Z. japonicus*等の耐圧性酵母があるが, この内には Stelling-Dekker の分類では蔗糖及びラフィノーズを弱醗酵するとされた菌種も含まれている. 従つて $F_{1\cdot2}$, $R_{1\cdot3}$, M_3, N_1, Q_2 の7菌株は *Sacch. rouxii* に該当するが, その内 N_1, $R_{1\cdot3}$ は蔗糖とラフィノーズを Dekker の試験と同じく醗酵したが別種とせず, F_1 はラフィノーズを醗酵し蔗糖を醗酵しないこともあつたが, 両糖相互の醗酵性からすれば蔗糖を醗酵すべきであつて Scarr[4] が指摘した如く耐圧性酵母の蔗糖転化は pH と緩衝力に影響されるから何れにしても非乃至弱醗酵性で重視するに及ばないと思う. R_1 は *Saccharomyces fermentati* (Saito) Lodder et van Rij に近似するが耐圧性でなく, 又 N_1 は*Zygosaccharomyces miso* r Mogi[5] としたがガラクトーズの醗酵性で僅に相違する. Q_2 は胞子生産が極めて困難で昆布汁寒天に於てのみ子嚢胞子を生産することが出来た. Q_2 はStellingDekker の分類では該当種を見つけ得なかつたが *Saccharomyces rouxii* の標式には全く一致した. M_3 は先に *Torulaspora* 属としたが硝酸塩の同化能 (±) を除いては胞子形, 醗酵性等から *Saccharomyces* 属となつて *Saccharomyces rouxii* によく一致した.

Hansenula H. et P. Sydow

Hansenula 属に就ては Wickerham[6] の研究が発表されたが全般的には従う事が出来なかつた. 然し同定に際しては Lodder & van Rij の分類と共に参照した.

2) *Hansenula anomala* (Hansen) H. et P. Sydow…… C_3

Stelling-Dekker の分類では C_3 は *Hansenula javanica* (Groenewege) Dekker に相当したが Wickerham と Lodder & van Rij は *H. anomala* 型と *H. javanica* 型の細胞形の相違を種の特徴と認めず *Hansenula anomala* に纏めた. *Hansenula schneggii* (Weber) Dekker にも近縁であるが *H. anomala* により一層近い種類と

考えた．又最近小林氏[7]の分離したペントーゼ同化性の *Hansenula tokyoensis* Kobayashi は*H. javanica* 型であつて C_3 には近縁であるが同じく *H. anomala* に合併されるべきものと思う．

***Deharyomyces* Lodder et van Rij nomen conservandum**

Lodder & van Rij は本属酵母の胞子形を必ずしも属の特徴とは認めず，又醱酵型の菌種を *Saccharomyces* 属に移した．本属に所属する菌株は Lodder[3] が Stelling-Dekker の分類を訂正した検索表により類縁関係を決めた後に新分類で決定した．長西氏[9]の分類表はこの研究の終了後に発表されたから全面的には従うことが出来なかつたが同氏の多数の報文は参照した．本属に入る供試酵母は一般的性質の外に次の項目に就ても試験された．

1) 出芽帯形成試験：— Lodder[8] は常に著しく出芽帯を生ずるものと決して形成しないものとに分けた．著者が麦芽汁 (10° Bllg.) を用いて観察した結果によれば概ね識別し得たが R_4 と P_2 のみは中間型で出芽帯を形成する点からは *Debaryomyces membranaefaciens* 型であるが産膜状態はむしろ *D. tyrocola* 型に入つて識別し難かつた．

2) ウレタン同化試験[10]：一基本培養基 (葡萄糖 2%, ウレタン 0.75%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.035% 及び寒天 2%) に 25°C, 5日間培養したが *Candida* sp. N_2, M_2 以外は殆ど発育を認めなかつた．

3) 乳糖同化黄色色素生産試験[11]：一葡萄糖とウレタンをそれぞれ乳糖とアスパラギンで置換し前記同様に試験した結果，R_4 のみ発育して黄色色素を生産した．

4) 仮菌絲形成試験：一本属菌と *Candida* 属菌の関連性に着目し所蔵本属菌全部に就て仮菌絲形成試験を Lodder の仮菌絲形成用培養基を用いて接着培養により行つた結果 *Debaryomyces japonicus* Naganishi に "Mycocandida" 型の仮菌絲を，S_2 に原始的な仮菌絲形成を認めた．Lodder & van Rij もこの試験を施行し *D. vini* Zimmermann が形成することを報告している．

最近著者[12]は各種糖類からの生酸性に基く分類法を提案した．産膜性菌種に関する著者と Lodder & van Rij の分類を比較表示すれば Table 2 の如く，全般的によく一致するが後述するような若干の相違がある．本属の既知全菌種に就ては生酸性を確めることが出来なかつたから，長西氏の乳糖同化性菌種は乳糖から酸を生成すると考え I 群とした．なお長西氏[9]が指摘した如く本属菌の醱酵性は分類の key に採用し得ないから重視せず各種糖類から酸を生成するか否かを他属の醱酵性の如く重要な特徴とした．

3) *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et van Rij…… B_1, R_4

B_1 は *Debaryomyces guilliermondii* Dekker よりも適温が低く，R_4 は *D. tyrocola* var. *hansenii* Dekker より細胞が稍大きく且つ酒精同化試験ではよく発育するが産膜しない，又出芽帯形成試験では中間型であるが，B_1 と R_4 は共に葡萄糖，蔗糖，麦芽糖，及び乳糖から生酸し著者の I 群，Lodder & van Rij の *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et van Rij に該当した．

4) *Debaryomyces nicotianae* Giovannozzi. …… $C_{1\text{-}4}$, P_2, $Q_{3\text{-}4}$, S_3, O_9

$C_{1\text{-}4}$, $Q_{3\text{-}4}$, S_3 は *D. tyrocola* 型で O_9 は *D. membranaefaciens* 型となり P_2 は其中間型であるが Lodder & van Rij は両型相互の産膜状態に変異性を認め Stelling-Dekker や Lodder の如く皮膜の皺の有無等の被膜状態を種の特徴と認めていない．Lodder & van Rij は *D. tyrocola*, *D. guilliermondii* 及び *D. membranaefaciens* を一緒に

Table 2. Comparison between the classification system of *Debaryomyces* concerning pellicle-forming group.

The author's system	Lodder & van Rij's system.
I. Acid from glucose, sucrose, maltose and lactose.	1a. Early formation of a dull, dry, creeping pellicle on malt extract.
*D. *guilliermondii* strain K *D. sp. H. Cesari et Guill. (*D. guil.* ?) *D. *guilliermondii* Dekker D. *guil.* var. *nova-zeelandicus* Lodder *D. *tyrocola* Konokotina *D. 〃 strain Sb. Dekker D. 〃 var. *hansenii* Dekker D. *orientalis* Naganishi ? D. sp. R_4	2a. Lactose is assimilated. ··· *D. hansenii* (Zopf) Lodder et van Rij synonym : *D. guilliermondii* Dekker *D. guill.* var. *nova-zeelandicus* Lodder *D. tyrocola* Konokotina *D. tyrocola* var. *hansenii* (Zopf) Dekker *D. cavensis* Giovannozzi
II. Acid from glucose, sucrose and maltose. a) Pellicle-forming group. b) Greyish white, folded pellicle on wort. *D. membranaefaciens* Naganishi	*D. membranaefaciens* Naganishi
D. 〃 var. *Zingiberi* Ohtani D. 〃 var. *hollandicus* Lodder D. sp. O_9, C_2 (*D. membranaefaciens* type) bb) Grey thin pellicle on wort. D. *miso* Mogi D. *miso* var. α Mogi D. *japonicus* Naganishi *D. *tyrocola* strain I, II, III, Op, α, β ? D. sp. $C_{1\text{-}4}$, P_2, $Q_{3\text{-}4}$ S_3, Y_1 (*D. tyrocola* type)	2b. Lactose is not assimilated. ··· *D. nicotianae* Giovannozzi synonym : *D. membranaefaciens* var. *hollandicus* L. *D. nicotianae* var. *minor* Giovannozzi *D. marylandii* Giovannozzi 1b. No pellicle on malt extract or only after long time cultivation.

Note : * shows the results of Naganishi's trial on the sugar assimilation test.

D. hansenii に入れその根拠を乳糖同化性に置いている．然し長西氏及び著者の分類では *D. membranaefaciens* は乳糖を同化せず又長西氏の亜硝酸同化性でも *D. guilliermondii* とは全く異るから別種と考えるのが妥当であると思う．又 *D. tyrocola* 中には乳糖非同化性の数菌株がある．従つて供試酵母は Stelling-Dekker の分類標式では前記の型になつて Lodder & van Rij はこれらを *D. hansenii* に合併しているが著者の試験では乳糖から生酸しないからむしろ *D. nicotianae* Giovannozzi に統合して乳糖から生酸する *D. guilliermondii* とは区別する方がよいと思う．

勿論，試験法の差異も考えられるが Wickerham の強化培地で長期間後に同化する如き弱同化性を理由に *D. membranaefaciens* を其の変種 *hollandicus* とそれぞれ別種とするよりは同一種にしたいと思う．なお *Debaryomyces miso* Mogi [13] は近縁であるが酒精を同化しない点で本項の何れとも異る．

5） *Debaryomyces kloeckeri* Guilliermond et Peju ····· $A_{1\text{-}2}$, S_4

$A_{1,2}$, S_4 は非産膜性で葡萄糖，蔗糖及び麦芽糖から酸を生じ著者は同一種と考えたが Lodder & van Rij の分類でも同様に *Debaryomyces kloeckeri* に統一している．この内には *D. sake* Saito et Oda も含まれているが著者の分類では *D. sake* 及び *D. matruchoti* Grigoraki et Peju の 1 菌株は蔗糖から生酸せず III 群に区別したので *D. kloeckeri* とは別種と考えたい．*D. orientalis* Naganishi [14] もまた *D. klocckeri* 型であるがウレタンを同化する点では本項の何れとも異る．

III. 新種並に新變種の分類と類縁関係

6） *Saccharomyces kyushuensis* nov. spec. …… E_1

E_1 は耐塩下に乾燥皮膜を作るから *Pichia*, *Debaryomyces* 及び *Saccharomyces* 属に就て検討すると *Pichia* 属とは仲長細胞を全く形成しない点，非乃至弱醱酵性の *Debaryomyces* 属とは耐塩下なお約80％の醱酵歩合を示す点[15]で異り *Saccharomyces* 属に該当する．葡萄糖とガラクトーズを醱酵しラフィノーズの微弱な醱酵性を認めたが蔗糖を全く醱酵しなかつたので前記の F_1 と同様の理由により重視出来ない．

Lodder & van Rij の分類では近縁種として *Saccharomyces delbrueckii* Lindner と *S. delbrueckii* var. *mongolicus* Saitoがあり醱酵性は一致するが皮膜を形成しないことと耐圧性でない点に於て異り，*S. mellis* Fabian et Quinet 及び *S. bisporus* Naganishi も近縁であるが醱酵性に相違がある．其の他近縁種には味噌から得た *Zygosaccharomyces tikumaensis* Mogi[16] と醱酵ソースから得た *Z. naniwaensis* Ohtani[17], *Z. sake* var. α Naganishi[14] があるが前者とは溶膠性と酒精同化性で異り，後者とは産膜性及び醱酵性に於て異る．

要するに E_1 は単糖類を醱酵し耐塩下に於て顕著な産膜性のある耐圧酵母であつて該当種を見出し得ないから新種であると見て著者は *Saccharomyces kyushuensis* nov. spec. と命名する．

7） *Debaryomyces oviformis* nov. spec. …… S_2

Lodder & van Rij の分類では *Debaryomyces kloeckeri* G. et P. に近縁であるが著者の分類では葡萄糖，蔗糖，麦芽糖及びラフィノーズから生酸する *D. kloeckeri* とは異り麦芽糖から生酸しない．又原始的な仮菌絲を形成する．従つて新種と見なし *Debaryomyces ovifomis* nov. spec. と命名する．

8） *Debaryomyces nicotianae* Giovannozzi var. *salsus* nov. var. …… C_2

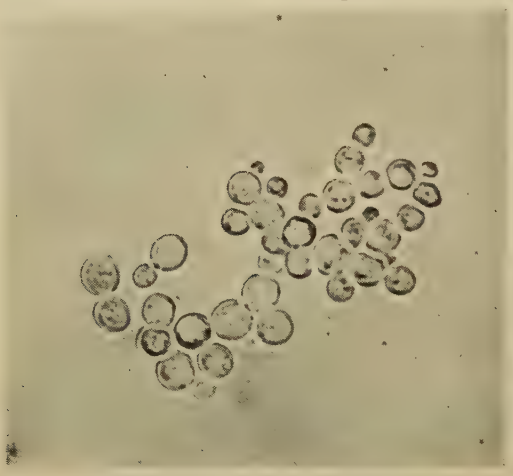
著者の分類では *Debaryomyces membranaefaciens* 型に入り Lodder & van Rij のそれに従うと *D. nicotianae* に相当する．長西氏[18]の本属菌に関する研究によれば巨大聚落（麦芽汁膠培養）は「不鮮明なる放射状の条絞又は扇状絞を有するも年輪状の条絞を認め難く中心部には凸凹部を生ぜず」従つて「菌株分類上の一助として価値僅少なるものと思惟せらる」と．著者の分離した多くの本属菌に就ても同様のことが言い得るが独り C_2 のみは他のいづれの巨大聚落とも異り（写真参照，本誌 12, 379, 1952）多数の年輪状の皺層と膠中に瘤状に没入する著しい特徴をもつている．

従つて *Debaryomyces nicotianae* の新変種と見て *Debaryomyces nicotianae* var. *salsus* nov. var. と命名する．

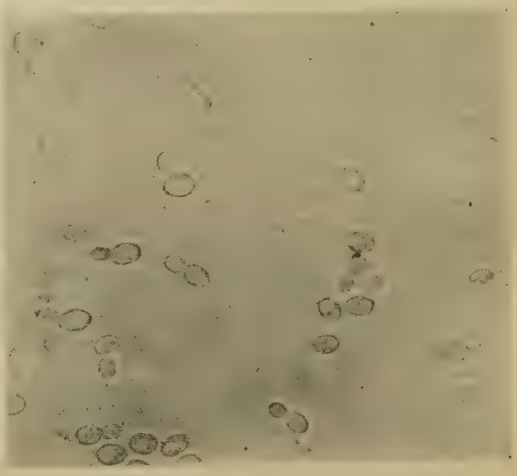
IV. 新種並に新變種の標式

塩辛酵母の内，真正酵母の新種 *Saccharomyces kyushuensis* nov. spec. と *Debaryomyces oviformis* nov. spec. 並に新変種 *Debaryomyces nicotianae* var. *salsus* nov. var. に就て次の如く標式を与える．

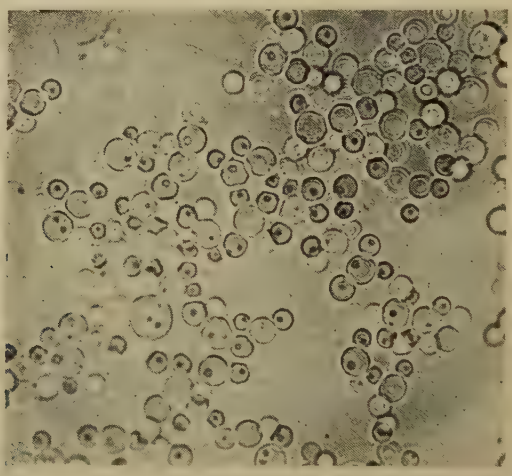
Vegetative cells of three new yeasts.



Saccharomyces kyushuensis nov. spec. (800×).



Debaryomyces oviformis nov. spec. (700×).



Debaryomyces nicotianae var. *salsus* nov. var. (820×).

Description of the synopsis of three new yeasts

Saccharomyces kyushuensis nov. spec. ..... E_1

Cells predominantly round, 4.8～6.4μ, some oval, 4.8～8.0μ. Thin pellicle on wort. Wort agar slant : yellowish white, sebaceous, raised, entire edges, finely papillate in old culture. Gelatine liquefaction : positive after 50 days. Giant colony on wort gelatine : greyish brown, sebaceous, circular, generally flat, small crater and entire. Sporulation after heterogamic or isogamic conjugation, spore round, 3.0～4.0 μ, 1 to 3 spores per ascus. Glucose and galactose are fermented, raffinose fermented very weakly. Nitrate not utilized. No growth in ethyl alcohol. Salt tolerance : folded pellicle formation on 15% NaCl glucose broth. Growth : opt. temp. 25～30°C and opt. pH 4.1～5.2. The thermal death point : ten minutes at 60°C.

Debaryomyces oviformis nov. spec. ……S_2

Cells predominantly oval or short ellipsoid, 3.2～4.8×4.8～6.4μ, some round, 4.8～5.4μ. On wort : ring and sediment. Wort agar slant : light yellow, slightly raised, fine folds at the border, and erose. Gelatine not liquefied. Giant colony on wort gelatine : pulvinate, circular, brownish yellow at the center, grey at the border, some radial sectors and erose. Spore warty, round, 2.4～4.0μ, 1 or 2 spores per ascus. Primitive pseudomycelium is produced. Acid from glucose, sucrose and raffinose. Nitrate not utilized. No growth in ethyl alcohol. Salt tolerance at 15% NaCl glucose broth. Growth : opt. temp. 25～30° C and opt. pH 4.1～7.2. The thermal death point : ten minutes at 55°C.

Debaryomyces nicotianae Giovannozzi var. *salsus* nov. var. ……C_2

Cells generally round, 4.8～6.4μ. On wort : pellicle is formed with a fine network of folds, and sediment. Wort agar slant ; greyish white, slightly glistening, rough spreading surface and lobated edges. Giant colony on wort gelatine : dry, white, irregular circular colony, the characteristics of which is that it has many concentric rings (see photograph, this bulletin 12, 378, 1952). No gas from sugar but acid from glucose, sucrose, maltose, galactose and raffinose. Nitrate not utilized. Growth in ethyl alcohol : white powdery pellicle and abundunt sediment. Salt tolerance : heavy pellicle formation on 20% NaCl glucose broth. Spore warty, round, 3.0～4.0μ, usually one spore per ascus. Growth : opt. temp. 21～25°C and opt. pH 4.1～6.2. The thermal death point : ten minutes at 55°C.

総括並に考察

各種塩辛類から分離した真正酵母 23 菌株は Lodder & van Rij の分類に従い *Saccharmyces rouxii*, *Hansenula anomala*, *Debaryomyces hansenii*, *D. nicotianae* 及び *D. kloeckeri* の既知酵母5種と *Saccharomyces kyushuensis* nov. spec., *Debaryomyces oviformis* nov. spec. 及び *D. nicotianae* var. *salsus* nov. var, の3新酵母と決定した.

Saccharomyces rouxii 中には Table 1 の如く醤油・味噌酵母を含み，先に塩辛酵母中の *Zygosaccharomyces* 属が味噌・醤油酵母と密接な関係のあることを指摘したがこれを確証することが出来た. なお従来塩汁から分離されたことのない非産膜性且つ耐塩性の *Debaryomyces kloeckeri* を3菌株得た事はこれら菌株が多く動物性物料から来源したことと考え合せ興味あることと思う.

この研究は九大農学部水産化学教室で行われたもので終始懇篤な御指導を賜つた富安教授に深謝の意を表する. なお，文部省科学研究費（富安教授）に拠つた，記して謝意を表する次第である.

文 献

1) 銭谷武平：九大農学芸雑誌，**12**，247，375，383 (1952).
2) Stelling-Dekker, N. M. : Die sporogenen Hefen. (1931).
3) Lodder, J. and N. J. W. Kreger-van Rij : The Yeasts, a taxonomic study (1952).
4) Scarr, M. P. : J. Gen. Microbiol., **5**, 704 (1951) ((3) の p. 151 から引用).
5) 茂木正利：農化，**15**，1229 (1939).
6) Wickerham, L. J. : "Taxonomy of Yeast", Tech. Bull. No. 1029, U. S. Dept. Agric., (1951).
7) 小林達吉：木材糖化液に適する酵母に関する研究 (1950) (謄写刷).
8) Lodder, J. : Zentral. Bakt., II, **86**, 227 (1932).
9) 長西広輔：醗工，**26**，345 (1948).
10) 長西広輔：醸学，**18**，731 (1940).
11) 長西広輔：日本学術協会報告，**10**，772 (1935)，醸学，**15**，100 (1937).
12) 銭谷武平：九大農紀要 (投稿中).
13) 茂木正利：農化，**14**，1311 (1938).
14) 長西広輔：醸学，**19**，14 (1941).
15) 富安行雄，銭谷武平：日水誌，(投稿中).
16) 茂木正利：農化，**18**，739 (1942).
17) 大谷義夫：醸学，**9**，645 (1931).
18) 長西広輔：醸学，**18**，681 (1940).

Résumé

A taxonomic study on 23 strains of true yeasts which were isolated from various kinds of "Shiokara" is presented.

These yeasts were identified by the newly published classification of Lodder & van Rij, while their mycological, general features had mainly been studied by the method of Stelling-Dekker. In the classification of *Debaryomyces*, the author did not attach very much value to the fermentability, but adopted the acid production test. The comparison between the classification system of the author and that of Lodder & van Rij concerning pellicle-forming group is shown in table 2.

The identified yeasts were reduced to the following eights pecies in the order of frequency of isolation; *Saccharomyces rouxii* 7 strains, *Debaryomyces nicotianae* 7 st. (one variety), *D. kloeckeri* 3 st., *D. hansenii* 2 st. and *Hansenula anomala* 1 st. and three new species; *Saccharomyces kyushuensis* nov. spec., *Debaryomyces oviformis* nov. spec. and *Debaryomyces nicotianae* var. *salsus* nov. var. The relation between the taxonomy of Lodder & van Rij and that of Stelling-Dekker is shown in table 1.

The author demonstrated the fact that "Shiokara-yeasts" are closely related to the so-called "Shoyu-" and "Miso yeasts, indicating the existence of *Zygosaccharomyces soja*, *Z. major* var. *miso*, *Z. japonicus* and *Z. miso* γ.

水産醱酵食品の酵母に関する研究

（第5報） 無胞子酵母菌の形態学的特徴に就て

銭　谷　武　平

Yeasts occurring in fishery-fermentation products Part 5. On the morphological characteristics of asporogenous yeasts

Buhei Zenitani

九州大学農学部学芸雑誌，第14巻，第4号，別刷
REPRINTED FROM THE SCIENCE BULLETIN OF THE FACULTY OF AGRICULTURE, KYUSHU UNIVERSITY,
VOL. 14, NO. 4, SEPTEMBER, 1954

水産醱酵食品の酵母に関する研究

（第5報） 無胞子酵母菌の形態学的特徴に就て

銭　谷　武　平

Yeasts occurring in fishery-fermentation products Part 5. On the morphological characteristics of asporogenous yeasts

Buhei Zenitani

緒　　言

先に真正酵母菌の種類に就て報告[1]したが，本報では無胞子酵母菌の形態学的特徴に就て述べる．従来，農産醱酵食品から分離された無胞子酵母菌は *Torula*, *Monilia*（醤油醪），[2] *Torulopsis*, *Pseudomycoderma*, *Pseudomonilia*（味噌），[2] *Mycoderma*,[3] *Candida*, *Brettanomyces* 及び *Kloeckera*（*Pickles*）[4] の諸属で，水産醱酵食品からはすべて *Torula* 属[5] であつた．然し分類法の進歩により種・属の改廃が多く，前記酵母の内には整理・統合すべきものもあると考えられる．

無胞子酵母の Pseudomycel, Blastospore 及び Arthrospore 形成等の無性増殖の特徴は分類上極めて重要な意義があるにも拘わらず既往の報告のうちにはこれらの形成試験を欠くか或は記載が不充分で比較同定できぬものがあるので，それ等の形成試験に重点を置いて研究した．その結果，大多数の菌株が仮菌絲および胞子器を形成し，無胞子酵母の *Candida* 属に該当することを確め水産醱酵食品中の酵母は菌相上，他の醱酵食品とは異る著るしい特異性をもつことを明らかにした．

実　験　の　部

1）供試菌株（無胞子酵母の認定）

供試酵母が無胞子酵母であると決定することは極めて困難な問題であるが，既報[6] の 13 種の試験法により Lodder[7] の如く5週間後に形成しないものを無胞子酵母とした．然し細胞内容等の状態変化から胞子形成が予想される場合は適宜に試験期間を延長した．かくして胞子を生産しない D_1, O_2, K_1, $M_{1.2}$, N_2 及び $S_{1.5}$ の8菌株を無胞子酵母と認定した．

2）無胞子酵母の無性増殖の特徴

供試酵母はすべて出芽増殖し，更にその特徴である仮菌絲や胞子器などの形成能否を決

定するために普通の Talice 法を採用した．然しこの試験法のみに依存し得ないことを確めたので種々の試験方法に就て検討した．

試験方法：一従来，仮菌絲形成の試験培養基として馬鈴薯汁，玉蜀黍粉寒天，葡萄糖ペプトン寒天，米糠汁寒天，加糖馬鈴薯寒天，人參寒天及び特殊培養基として小林氏[9]のニコチン培養基が報告されている．著者は試験方法として 1）馬鈴薯汁（Talice 法：Lodder[7]により調製し1週間培養し仮菌絲を形成せぬ時は2回反復試験する），2）玉蜀黍粉寒天（Benham 法：Martin[10]により平板培養した），3）葡萄糖ペプトン寒天[7]：接着培養，30°C，4）米糠汁寒天[11]，5）加糖馬鈴薯寒天並びに人參寒天（Diddens & Lodder 法)[12]に穿刺培養した．

Table 1. Summarized results of the tests of pseudomycelium- and blastospore-formation.

Strain	PM.	BS.	AS.	Methods	Note
D_1 …	＋	＋	−	Adhesion culture with Lodder medium.	BS are small, usually oval or ellipsoid. Chlamydospore rare. See figure and photograph.
	＋	＋	−	Corn meal agar.	
K_1 …	+	+	−	Wort or Gorodkowa agar.	PM are observed in both media. BS are oval or ellipsoid or of some other forms.
	+	+	−		
M_2 …	+	+	−	Adhesion culture with Lodder medium.	No difference between the cells of pseudomycelium and blastospore. "Mycotoruloides type" in mature mycelia.
	＋	＋	−	Rice bran agar stab culture.	
	＋	＋	−	Corn meal agar.	
	＋	+	−	Carrot agar stab culture.	Generally "Mycocandida type," and the chain of oval cells frequently observed.
	＋	＋	−	Potato agar stab culture.	
N_2 …	＋	+	−	Ad. culture with Lodder medium.	"Mycocandida type" in mature mycelia. "Mycocandida-Mycotoruloides type." The development of PM not abundant.
	＋	＋	−	Rice bran agar stab culture.	
	+	+	−	Carrot agar stab culture.	
	+	+	−	Potato agar stab culture.	
	+	−?	−	Corn meal agar.	
S_1 …	(+)	−?	−	Glucose-peptone agar.	
S_5 …	+	+	−	Ad. culture with Lodder medium.	"Blastodendrion type."
	+	±	−	Rice bran agar stab culture.	
	+	−?	−	Corn meal agar.	

Note: PM··pseudomycelium, BS··blastospore, AS··arthrospore. Ad. culture··· adhesion culture.
Lodder medium consists of 2% glucose, 1% peptone and 2% agar.

試験結果及び観察事項：一結果の概要は Table 1 に表示した．即ち，1）法では殆ど仮菌絲形成が認められず，2）法でも若干の菌株が不充分な発育をしたにすぎず，3）法では多数の菌株に仮菌絲又は Blastospore の形成を認めた．然し接着培養では同一株でも寒天膜の厚薄，接種量の多少により発育形態が著しく違い(例えば D_1)，分類学的見地から仮菌絲に着生する Blastospore の配置状態を確めるには常に同様な形態的特徴を示し難い．4）法は何れの方法よりも仮菌絲形成が容易に行われ，簡易にして略々同一条件を保持し易く分類上の有効な試験方法であると思う．Diddens & Lodder 法と比較検討したが，米糠汁寒天を用いる穿刺法は前者に比し遜色のないことが確められた．次に数例を Figure 1 と 2 に図示した．

M_2 は 3）と 4）法で全く発育状況を異にし，接着培養では胞子器に相当する細胞が仮菌絲細胞間に輪生又は群生し仮菌絲細胞と区別し難いが，4）法では "*Mycotoruloides*" 型の配列を示した．又 S_5 は特有の細胞が "*Blastodendrion*" 型の状態を示した．特に D_1 は Chlamydospore と考えられる厚膜細胞を形成したが，Chlamydospore は Lodder & van Rij の検索[8] によつても稀に *Candida albicans* のみが形成するもののようである．

3）増殖細胞の形態とその大きさ

試験方法：一常法に従い新鮮培養から麦芽汁（15° Bllg.）に接種し 25° C に於て 6 日間培養しその沈澱酵母に就て観察した．なお Sabouraud 寒天に就ても同様に観察した．

Table 2. Vegetative cell of asporogenous yeasts.

Strain	Form	Size (μ)			Note
		Round	Oval or ellipsoid	Elongate	
D_1	Generally ellipsoid, some round or elongate.	3.2～4.0	2.4～3.2 × 4.0～5.6	2.0～3.2 × 6.4～9.6	Homogeneous, one vacuole and one dancing body.
K_1	Generally oval or long pseudomycelial cells.		2 × 3	2.0～2.5 × 11.0～16.0	Pseudomycelia are formed.
M_1	Predominantly ellipsoid.		3.2～4.0 × 4.0～4.8		Budding chains abundant. Homogeneous, one vacuole.
M_2	Predominantly ellipsoid, some round.	4.8～5.4	4.0～4.8 × 4.8～5.6		Homogeneous and clear.
N_2	Ditto.	4.8～5.4	3.2～4.8 × 4.8～6.4		Homogeneous or one oily drop.
O_2	Predominantly oval, some round.	3.2～4.0	3.2～4.8 × 4.0～5.6		Budding chains and one dancing body.
S_1	Generally round, some of other forms.	4.0～5.5			Some cells having wart at both terminals, one oily drop.
S_5	Ellipsoid, cucumber-shaped, and of other forms.		2.4～3.2 × 3.2～5.6	1.6～2.4 × 11～16	Polymorphous, pseudomycelia are formed.

Wort-culture (15° Bllg.) six days at 25° C.

試験結果:—麦芽汁培養の試験結果のみを Table 2 に表示した.

一般に塩辛中の他の真正酵母にくらべて種々の形態を示し大さも比較的小さい. 麦芽汁培養中に既に仮菌絲態の発育をした細胞が認められる菌株もあり, 特に S_5 では特異な円錐状の細胞も認められた. 又 Sabouraud 寒天上では O_2 は巾広き出芽部をもち *Pityrosporum* 属の如きフラスコ状の細胞を認め, S_1 は表面に突起をもつレモン状又は金米糖類似の細胞も観察されたことは興味ある事実と思う.

考察並に総括

上記の形態学的特徴を基にして, Lodder & van Rij の分類法[8] により同定すれば *Cryptococcaceae* 科の *Cryptococcoideae* 亜科に入る. 仮菌絲, Blastospore を形成し Arthrospore を形成せず *Candida* 属に所属する. 但し M_1 と O_2 は共にそれ等を形成せず Torulopsis 属に該当する. 仮菌絲は単に普通の Talice 法では形成せず *Torulopsis* 属等に編入される恐れがあるから無性増殖の特徴は種々の方法に就て検討すべきである. 各種試験法の内, 富安・著者の米糠汁寒天穿刺法は仮菌絲形成試験法として Diddens & Lodder 法 (Lodder & van Rij 法も同様) に劣らぬ方法であることが確められた. なお水産醗酵食品中の無胞子酵母の殆んどすべてが *Candida* 属 (M_1 と O_2 は *Torulopsis* 属であるが, 後報で述べる如く *Debaryomyces* 属の imperfect form と見做される) であることは他の醗酵食品とは異る菌相上の著しい特徴であると思う.

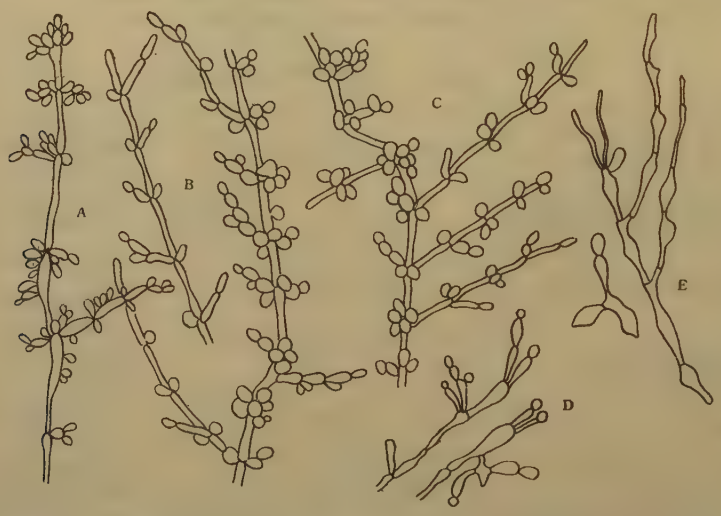
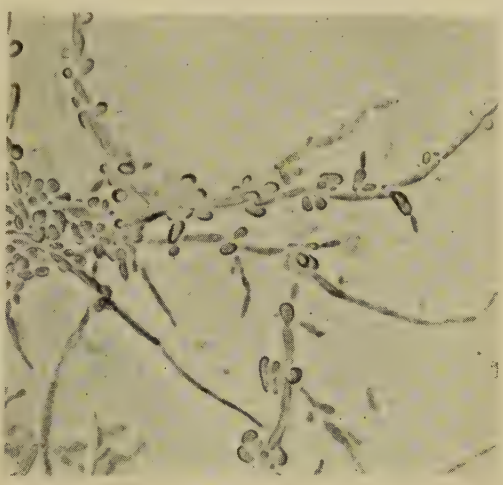


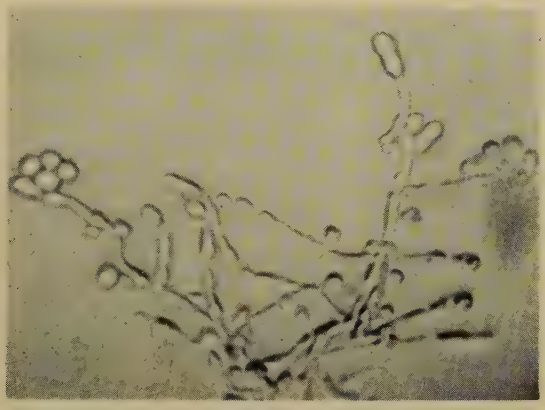
Figure 1. Characteristics of the vegetative reproduction, showing the various types of pseudomycelia- and blastospores-formation.

A···*Candida* sp. D_1···adhesion culture with Lodder's medium, B···*C.* sp. M_2 and C···*C.* sp. N_2 stab culture in rice bran agar, D···*C.* sp. S_5 adhesion culture with Lodder's medium and E··· *C.* sp. S_5 stab culture in rice bran agar.

Candida sp. M_2.



Candida sp. N_2.



Candida sp. D_1.

Figure 2. *Candida* sp. M_2, N_2 and D_1, showing appearance of pseudomycelia as seen in an adhesion culture with Lodder's peptone-glucose agar.

本研究は九大農学部水産化学教室で実施したものであつて，終始懇篤な御指導を賜つた富安教授に深謝の意を表する．なお文部省科学研究費（富安教授）によつた．

参考文献

1) 錢谷武平：九大農・学芸雑誌，**14**，301 (1953).
2) 茂木正利：農学，**3**，92 (1949).
3) Mrak, E. M. and Bonar, L.: Zentral. Bakt., II, **100**, 289 (1939).
4) Etchells, J. L. and Bell, T. A.: Food Tech., **4**, 77 (1950), Farlowia, **4**, 87 (1950).
5) 喜多源逸：工化，**15**，151 (1911)，木村・小谷：水講報告，**22**，292 (1927).

6) 銭谷武平：九大農・学芸雑誌，**12**，247 (1952).
7) Lodder, J.: Die anascosporogenen Hefen, 1 Hälfte (1934).
8) Lodder, J. and N. J. W. K. van Rij: The Yeasts, a taxonomic study (1952).
9) 小林達吉：昭和24年度科研費による研究集録，農学編，p. 91 (1950).
10) Martin, D. S. *et al.*: J. Bact., **34**, 99 (1937).
11) 富安・銭谷：農化，**25**，406 (1952).
12) Diddens, H. A. und Lodder, J.: Die anascosporogenen Hefen, Zweite Hälfte (1942).

Résumé

In this paper, observations on the morphological properties of eight asporogenous yeasts, the characteristics of the vegetative reproduction, and the shape or the size of the vegetative cells are described.

The pseudomycelia were not produced in 1) potato juice, and their formation was not sufficient on 2) corn meal agar plate. They were formed considerably by 3) adhesion culture with glucose-peptone agar medium. However, from the taxonomic viewpoint, method 3) seems to be unsuitable, because the growth form varies remarkably with the thickness of agar medium and the amount of inoculation. Stab culture methods in 4) rice bran extract agar or 5) potato agar and carrot agar gave good results. The author considers method 4) especially suitable as the routine diagnostic test of pseudomycelium formation. The results of these tests are summarized in Table 1, and the various types of pseudomycelium are indicated in Figure 1 and 2. The shape and the size of vegetative cells of asporogenous yeasts tested are shown in Table 2.

Since almost all of the asporogenous yeasts of "Shiokara" belong to *Candida*, a yeast flora of it must be considered to be different from those of the other fermentation products.

雲丹塩辛の異常醱酵に就て

富安行雄・銭谷武平
（九大農学部水産化学教室）

On Gaseous Fermentation in "Uni-shiokara"

Yukio TOMIYASU and Buhei ZENITANI

The gaseous fermentation in "Uni-shiokara" has frequently been caused by salt tolerant yeasts, resulting in its softening and loss of palatableness. *Debaryomyces kloeckeri*, *D. hansenii*, *D. nicotianae* and its variety, *Hansenula anomala* and *Candida* species were found in the normal products, while *Saccharomyces rouxii* BOUTROUX or a new species named *Saccharomyces kyushuensis* ZENITANI were isolated from all of the products spoiled by gaseous fermentation.

The possibilities of gaseous fermentation under high salt condition were tested with various kinds of yeasts (32 strains) and it was found that the fermenters in such condition were all of *Zygosaccharomyces* species (7 strains) and *Torulaspora* sp. M_3 (Table 1). But as *Torulaspora* sp. M_3 was very slow in fermenting, we consider *Zygosaccharomyces* species chiefly responsible for the gaseous fermentation of "Uni-shiokara". Lodder & van Rij (1952) rejected the genus *Zygosaccharomyces* and included the species brought to this genus in the genus *Saccharomyces*. According to their classification, the yeasts causing gaseous fermentation in "Uni-shiokara" are *Saccharomyces rouxii* and *Saccharomyces kyushuensis*. Some of their physiological properties are shown in table 2.

Such abnormal fermentation will be inhibited by adding vitamin K_3.

雲丹塩辛は普通，泥雲丹と練雲丹とに区別され脱水度の低い泥雲丹は往々異常醱酵を起して軟化し香味を損うことがある。木村，小谷両氏[1]は2種の *Torula* 属酵母を分離して其の原因とした。

著者等は異常醱酵した製品から分離した酵母は勿論其他の種々の酵母に就て耐塩下に於ける醱酵能否を吟味した結果，旧分類の *Zygosaccharomyces* 属に入る全菌株と *Torulaspora* sp. M_3 が醱酵を起すことを確めた。之等の菌株は LODDER & van RIJ の新分類に従えば総て *Saccharomyces* 属となり *Saccharomyces rouxii* BOUTROUX と *Saccharomyces kyushuensis* ZENITANI（新種）の2種が異常醱酵の有力な原体である事を明らかにした。なお異常醱酵はビタミン K_3 によつて防止しうることを確めたので報告する。

I. 雲丹塩辛の微生物に就て

真正酵母は別報[2]の如く普通製品では主として *Debaryomyces kloeckeri*, *D. hansenii*, *D. nicotianae* 及び其の変種又は *Hansenula anomala* が見出され，異常醱酵した製品からは *Saccharomyces rouxii* 及び *Saccharomyces kyushuensis* が分離された。而して無胞子酵母は *Candida* 属であつた。細菌類に就て佐々木氏[3]は *Bacillus subtilis* I 及び II 並に *B. mesentericus* を分離した。然しこれらはガス醱酵をしない。

従つて斯かる変敗の原体としては直接的には全く酵母菌が挙げ得られ細菌類は殆ど関係しないと考えられる。

1953年3月30日受理（印刷費負担）

Ⅱ. 異常醱酵の原体となる酵母に就て

雲丹塩辛の異常醱酵は酵母の醱酵作用に基くことは明らかであるが木村氏[4]は同氏の分離した *Torula* はこの醱酵に対し決して特異のものでなくパン酵母でも，清酒酵母でも其他の *Torula* でも同様に醱酵すると述べている。著者等は異常醱酵の原体となりうるものを確めるために各種の塩辛酵母を始めパン酵母，酒精酵母等に就き含塩培養基を用いて醱酵能否を試験した。

a) 含塩培地に於ける醱酵能否試験：—— 各種塩辛類の分析例を基にして基本培地（肉エキス1分，ペプトン1分，食塩15分，葡萄糖5分及び水道水55分）を選び，各種酵母の 25°C に於ける試験管培養に就き醱酵能否を試験した。供試酵母は酒精酵母（Rasse Ⅱ），パン酵母（フライシュマン，三共），清酒酵母 *Saccharomyces sake*，塩辛酵母（*Zygosaccharomyces* sp. E_1, $F_{1\cdot2}$, N_1, Q_2, $R_{1\cdot3}$, *Torulaspora* sp. M_3, *Hansenula anomala*, *Debaryomyces* sp. A_2, $C_{1\cdot2\cdot4}$, O_9, P_2, Q_3, R_4, S_4, *Candida* sp. N_2, K_1, D_1），及び *Debaryomyces membranaefaciens*, *Willia javanica*, *Monilia candida*, *Torula utilis* 及び *Mycotoruloides utilis* の計32菌株である。

b) 半固形含塩培地に於ける醱酵能否試験：—— 更に一般塩辛類の如き流動状乃至半固形培地に於ける醱酵能否を確めるべく前記基本培地に 0.2% 寒天と 10% 硅藻土を加えた半固形培地を用い 30°C に於て培養試験を行つた。

c) 試験結果：—— Table 1 の如く *Zygosaccharomyces* 属と *Torulaspora* sp. M_3 以外は殆ど醱酵せず僅に酒精酵母 Rasse Ⅱ が半カ月後に弱醱酵を起したにすぎなかつた。又半固形培地に於ても同様醱酵するが醱酵開始は僅に遅延する。なお Rasse Ⅱ は醱酵しなかつた。従つて斯かる試験範囲では醱酵を惹起し得るものは塩辛酵母中の *Zygosaccharomyces* 属の全菌株と *Torulaspora* sp. M_3 に限られる様である。

Table 1. The rate of fermentation in the semi-solid and the liquid media containing high salt.

By the classification of Stelling-Dekker(1931)		By the classification of Lodder & van Rij(1952)	Medium Ⅰ Days 2	4	6	8	10	Madium Ⅱ Days 2	4	6	8	10	12
Zygosaccharomyces sp.	E_1…	*Saccharomyces kyushuensis*	±	++	+++	++	+	−	+	++	+++	+++	++
Zygosacch. soja	F_1…		+	++	+++	++	+	−	±	++	++	++	++
〃 〃	F_2		−	++	+++	++	++	−	+	++	++	++	++
Zygosacch. miso	N_1		−	++	+++	+	±	−	±	++	+++	+++	++
Zygosacch. major var. miso	R_1	*Sacch. rouxii* strain	±	++	+++	++	++	−	−	±	+	+	+
Zygosacch. japonicus	R_3		±	++	+++	++	+	−	+	+++	+++	+++	++
Zygosacch. sp.	Q_2		−	−	++	+++	++	−	−	−	+	+++	+++
Torulaspora sp.	M_3…		−	−	±	+	++	−	−	−	−	±	++

The other tested yeasts are as follows: Alcohol yeast (Rasse II), baker yeast (Fleischmann), *Saccharomyces sake*, Shiokara-yeasts (*Debaryomyces* sp. A_2, $C_{1\cdot2\cdot4}$, O_9, P_2, Q_2, R_4, S_4, *Hansenula anomala*, *Candida* sp. N_2, K_1, D_1), *Debaryomyces membranaefaciens*, *Willia javanica*, *Monilia candida*, *Torula utilis*, *Mycotoruloides utilis*. They did not ferment.

Note. Medium I. Meat extracts 1, peptone 1, sodium chloride 15, glucose 5 and water 55 parts. Medium Ⅱ was prepared by adding 0.2% agar and 10% diatom earth to medium I.

d) 耐塩下に於ける醱酵状況：—— 顕著な醱酵を行う *Zygosaccharomyces* 属菌等に就き 15% 食塩と 5% 葡萄糖を含む Hayduck 培地に供試酵母を接種し醱酵状態を調べた。ガス醱酵状況から見れば *Zygosaccharomyces* 属は孰れも醱酵開始後，弧状に上昇する醱酵曲線を示し，醱酵歩合は約 80% 前後であるに比し *Torulaspora* sp. M_3 は緩慢に上昇する様な直線的傾向を以て醱酵し 34.3% の醱酵歩合であることか

ら *Zygosaccharomyces* 属が異常醗酵特に急激な湧きに関与することが判つた。

Ⅲ. 異常醗酵の原因となる酵母の特性に就て

雲丹塩辛の異常醗酵は総て osmophile の *Saccharomyces rouxii* と *Saccharomyces kyushuensis* (Lodder & van Rij の新分類による) に基因し，前者の内には味噌，醤油酵母も含まれている。異常醗酵製品及び他の塩辛類に分布する異常醗酵の原体となる酵母の生理学的性質を摘録すれば Table 2 の如くである。即ち最適発育 pH は 4.0~7.0 にして塩辛類の pH も概ね此範囲内に入り，発育至適温度は 30°C

Table 2. Some physiological properties of yeasts causing gaseous fermentation in "Uni-shiokara".

Yeasts		Growth		Death	Salt tolerance	Fermentation					
		Opt. pH	Opt. tp			D	G	M	L	S	R
Saccharomyces kyushuensis ···	E_1	4.1–5.2	25–30°C	55°C	15%	+	+	−	−	−	±
Saccharomyces rouxii strain	F_1	4.1	30	55	20	+	−	+	−	−	±
	F_2	4.1	30	55	20	+	−	+	−	−	±
	N_1	5.0–6.3	25–35	60	25	+	−	+	−	+	±
	R_1	6.3–7.2	30–35	60	20	+	−	+	−	±	±
	R_3	5.0–6.0	30–35	60	20	+	−	+	−	+	±
	Q_3	6.5–7.2	30–35	60	25	+	−	+	−	−	−
	M_3	5.5–7.2	25–30	55	20	+	−	+	−	−	−

Note : Death-10 minutes at~C. D-glucose, g-galactose, M-maltose, L-lactose, S-sucrose and, R-raffinose.

前後で夏季気温に略々近く而も概ね 20% 食塩になお耐えることが出来る。又葡萄糖を孰れも醗酵し，上記の生理的性質からしても糖質に富み脱水の不充分な泥雲丹中に於ては気温の上昇に伴い容易に発育し，ガス醗酵を惹起するに至るものと思う。なお $R_{1\text{-}3}$ はアサリ塩辛の醗酵中のものから分離したものである。

Ⅳ. 異常醗酵のビタミン K_3 による防止試験

木村，小谷両氏[1]は醗酵防止法を種々考究され，現在酒精添加或は水分含量を 50% 以下[5]にすることにより略々此の目的は達成されている。微生物の発育阻止剤としてビタミン K 類が有効な事をさきに当教室[6]に於て確めたので K 類中最も有効な K_3 酒精液を用い若干の防止試験を行つて見た。

市販泥雲丹（食塩 11.55%，還元糖 2.1%，pH 5.5）を其儘，又は 10% 食塩含有の 5% 葡萄糖水溶液で5倍或は 10 倍に稀釈しビタミン K_3 酒精溶液（V. K_3 50% 酒精溶液 1mg/cc.）を添加し 30°C に於て醗酵の有無を 28 日間に亘り観察した結果 10mg/100g K 以上添加したものは全く醗酵を防止し得た。

長崎県水産試験場に於ては本試験の結果に基き昭和 27 年春，K_3 添加の雲丹塩辛を試製し従来の酒精雲丹に比し香味の優秀なことを認めた。詳細は別報に譲る。

考　　察

雲丹塩辛の熟成により葡萄糖を生成する事は Perlzweig & Barron[7] の研究で明らかで，耐塩下葡萄糖を醗酵する酵母は総て異常醗酵の原体となり得る。然し各種塩辛類から見出された *Debaryomyces* 属，*Hansenula* 属，*Candida* 属及び *Torulopsis* 属は総て非乃至弱醗酵性であるから之等の酵母は異常醗酵の原体とはなり得ない。*Zygosaccharomyces* 属は総て耐塩下よく醗酵し有力な原体で Lodder & van Rij[8] により *Saccharomyces* 属に統合されたが本属中の耐圧酵母は *Sacch. rouxii* と *Sacch. mellis* の2種で孰れも原体となり得る。前者は広く塩辛中に分布するが後者は全く見出し得ず *Sacch. mellis* と同系統の単

糖を醱酵する *Sacch. kyushuensis*（新種）を分離した。*Sacch. rouxii* 中には味噌，醤油酵母をも含む事から本質的には雲丹塩辛の異常醱酵を起す酵母と醤油，味噌の湧き酵母とは全く同種類であるか極めて親近な種類であると思う。

総　括

雲丹塩辛の異常醱酵は *Saccharomyces rouxii* Boutroux 及び *Saccharomyces kyushuensis* Zenitani に基因する。なお異常醱酵はビタミン K_3 の添加によつて防止し得る。

文　献

1) 木村金太郎，小谷和夫：水講報告，**22**，292 (1927).
2) 錢谷武平：九大農学芸雑誌，**12**，383 (1952).
3) 佐々木薀二：醸学，**21**，733 (1943).
4) 木村金太郎：糧食研究，**142**，16 (1938).
5) 木村金太郎，小谷和夫：糧食，**165**，178 (1940).
6) 富安行雄外3名：醸工，**29**，187 (1951) **30**，1 (1952).
7) W. A. Perlzweig, and E. S. G. Barron: *J. Biol. Chem.*, **79**, 19 (1928).
8) J. Lodder, and N. J. W. Kreger-van Rij: "The Yeasts, a taxonomic study" (1952).

魚体成分の抗菌作用に関する研究—Ⅲ.
不飽和脂肪酸メチールエステルの抗菌作用

富安行雄・豊水正道
（九州大学農学部水産化学教室）

Studies on the Action of Fish Components—Ⅲ.
The Antibiotic Action of Methyl Esters of Unsaturated Fatty Acids

Yukio Tomiyasu and Masamichi Toyomizu

In the preceding papers[1] the authors described that the production of the antibiotic action of fish oils by adding cupric sulfate depended upon unsaturated fatty acid, and also that some vegetable oils interfered with this action.

In the present report we have described the relation between the antibiotic action and the variation of iodine value and peroxide value, when several kinds of methyl esters of unsaturated fatty acids were allowed to stand at 30° ; and the interference of vegetable oil with antibiotic action has also been referred to.

The antibiotic action of the methyl esters was produced spontaneously with the lapse of time, that is without the addition of cupric sulfate, and the activity was proportional to the number of the double bond. The antibiotic activity with the cupric sulfate and that without cupric sulfate varied parallelly, the former always having much greater activity than the latter. The antibiotic activity increased after remarkable decrease of iodine value at the early stage, and showed the highest value at a certain time. After this the activity gradually decreased. The decrease stopped at a certain time while there was no cessation in the decrease of iodine value. The increase of peroxide value continued independently of the antibiotic activity at least for 50 days (Table 1-4).

As in the case of adding cupric sulfate (Report 2), the addition of sesame oil and linseed oil interfered remarkably with the antibiotic action of methyl esters of unsaturated fatty acids, which was produced spontaneously when they were let alone at 30° (Table 5).

著者等[1]は前報に於て魚油の硫酸銅添加による *Debaryomyces membranaefaciens*（以下 *D. m.* と略記する）に対する抗菌作用は不飽和脂肪酸特に高度不飽和脂肪酸に基きその作用は二三の植物油によつて阻害されることを報告した。

R. S. Harris 等[2]は油脂の紫外線照射による抗菌作用を研究中鯖油，海豹油及び高級脂肪酸を含有するある種の魚油は紫外線を照射しなくても *Staphylococcus aureus* に対して殺菌的に作用することを報告しているが，これ等油脂の採取後試験迄の期日に就ては記載がない。著者等は開封直後の亜麻仁油（沃素価 164.58）はそのままでは抗菌作用を示さないがこれを栓なしに約1年間室温に放置したもの（沃素価 111.24）は

1952 年 1 月 28 日受理

硫酸銅を添加しなくてもペプトン・ハイダック培地 10 cc に対して 0.25 g 添加すると（即ち 40 倍）*D. m.* の発育を阻止し，又相当古くなつた鰮油は 200 倍で，採油後 6 ケ月を経過したシユモクザメの肝油も同様に 200 倍でそれぞれ硫酸銅を添加しなくても *D. m.* の発育を完全に阻止することを知つた。

これ等の抗菌作用も銅塩添加の場合と同様に不飽和脂肪酸に基くのではないかと考え不飽和脂肪酸メチールを 30° に放置して時日の経過に伴う抗菌力並びに沃素価及び過酸化物価（以下 I.V. 及び P.O.V. と略記）の変化を追求してこれ等の関係を明かにした。又空気中に放置して生成する不飽和脂肪酸メチールの抗菌作用も亦第2報に記した硫酸銅添加の場合と同様に植物油の添加により阻害されることを知つた。

実 験 の 部

1 時日の経過による不飽和脂肪酸メチールの抗菌力生成

第2報の方法[1]により調製したオレイン酸メチール，リノール酸メチール，リノレン酸メチール及び鰮酸メチールを試験管に入れ，ゴム栓をなして 30° に放置して一定期間毎に抗菌作用を硫酸銅添加の場合（硫酸銅の濃度 5×10^{-4}M）及び無添加の場合について常法により測定し，又同時にそれぞれの時期に於て I.V. 及び P.O.V. を測定した。P.O.V. は D.H. Wheeler 法[3]により定量し脂肪酸メチール 1 g の遊離した沃素に相当する 1 100 N チオ硫酸ソーダの cc 数を以て表わした。それ等の結果は第 1~4 表の如くである。

抗菌力は二重結合の数と共に増大し，各の脂肪酸メチールエステルに於ては硫酸銅添加の抗菌力と無添加のそれとは略平行して変化し，前者が常に遙かに大きかつた。抗菌力の増大の状態は調製時より時日の経過するに伴い増大しある時期に最高値を示し，それ以後は減少するがその減少はある時期に至つて止り，それ以降の抗菌力には全く変化がなかつた。抗菌力は調製後 15 日の鰮酸メチールが硫酸銅添加に於て 10,000 であり最大であつた。

I.V. 及び P.O.V. の変化も二重結合の数の増加と共に増大するが，これ等と抗菌力との関係は P.O.V. に於ては抗菌力には無関係に増加を示し，I.V. に於てはオレイン酸メチールを除いた他のメチールエステルでは抗菌力の増大する前に急激な減少が認められたが，抗菌力の減少が止り一定値となつても I.V. は減少を続けた。

1) オレイン酸メチール

オレイン酸メチールの抗菌力は硫酸銅添加の場合は 40 日迄は 40 倍でも *D. m.* の発育を完全には阻止し得なかつたが 50 日後には 100 倍で，60 日後より 90 日迄は 40 倍で *D. m.* の発育を完全に阻止した。硫酸銅無添加の場合は 50 日後に於て 40 倍で *D. m.* の発育を完全に阻止したのみで，それ以外の時は完全に阻止し得なかつた。I.V., P.O.V. は共に緩慢ではあるが略ゝ直線的に変化し 90 日後には I.V. は 84.48 より 75.25 となり，P.O.V. は 79.55 であつた。抗菌作用に大きな変化の表れた 50 日前後に於ても I.V. 及び P.O.V. には特に変化がなく，これ等と抗菌力との間には明かな関係は認められなかつた。

Table 1. Antibiotic action of methyl oleate.

Days (Temp. 30°)		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Iodine value		84.48	81.51	78.86	78.24	77.93	77.35	77.04	76.61	75.31	75.25
Peroxide value		0	4.75	17.45	36.25	39.96	49.23	54.88	66.83	74.43	79.55
Antibiotic activity $CuSO_4$	5×10^{-4}M	40 卌	40 卌	40 卌	40 +	40 ±	100−	40 −	40 −	40 −	40 −
	None	40 卌	40 卌	40 卌	40 卄	40 卄	40 −	40 ±	40 ±	40 ±	40 ±

2) リノール酸メチール

リノール酸メチールの抗菌力は硫酸銅添加の場合には調製時より 20 日迄は 100 であり，その後増大して

40 日後には最高値を示し 1,000 となり，それ以後は急激に減少して 50 日後には 200 となり，70 日迄変化しなかつた。硫酸銅無添加の場合は 20 日迄は 40 倍でも *D. m.* の発育を殆ど全く阻止し得なかつたが，30 日後には 133，50 日後には減少して 40 であつたが，60 日以降は 40 倍でも 完全には阻止し得なかつた。I. V. は 20 日迄は急激に減少し 20 日後には 169.75 より 141.51 となり，それ以降は緩慢な減少を示し 70 日後には 127.31 であつた。P. O. V. は略直線的に増加し 70 日後には 145.21 であつた。

Table 2. Antibiotic action of methyl linoleate.

Days (Temp. 30°)		0	10	20	30	40	50	60	70
Iodine value		169.75	157.08	141.51	141.08	139.53	138.33	131.88	127.31
Peroxide value		0	16.81	35.19	54.76	75.95	106.87	122.31	145.21
Antibiotic activity $CuSO_4$	5×10^{-4}M	100 —	100 —	100 —	400 —	1,000 —	200 —	200 —	200 —
	None	40 卅	40 卅	40 卅	133 —	133 —	40 —	40 ±	40 ±

3) リノレン酸メチール

リノレン酸メチールの抗菌力は硫酸銅添加の場合には調製時より 5 日迄は 200 であり，その後増大して 20 日後には 4,000 となり最高値を示し，それ以後は減少して 30 日後には 1,000 となり 70 日迄変化しなかつた。硫酸銅無添加の場合は 10 日後に 100，20 日後には 400 となりそれ以降は減少して 30 日後より 70 日迄は 200 であつた。I. V. は 5 日迄は急激に減少して 256.91 より 233.00 となりそれ以降は緩慢な減少を続け 70 日後には 189.06 であつた。P. O. V. は略直線的に増加し 70 日後には 158.17 であつた。

Table 3. Antibiotic action of methyl linolenate.

Days (Temp. 30°)		0	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70
Iodine value		256.91	233.00	232.23	231.43	229.64	226.94	214.98	214.43	209.17	200.92	189.06
Peroxide value		0	11.56	23.04	33.06	45.39	61.06	65.32	92.09	112.77	128.23	158.17
Antibiotic activity $CuSO_4$	5×10^{-4}M	200—	200—	1,000—	1,333—	4,000—	2,000—	1,000—	1,000—	1,000—	1,000—	1,000—
	None	40±	40±	100—	133—	400—	200—	200—	200—	200—	200—	200—

4. 鯡酸メチール

鯡酸メチールの抗菌力は硫酸銅添加の場合には調製時の 2,000 より漸次増大して 15 日後には 10,000 となり最高値を示し，それ以降は減少して 25 日後には 1,333 となり 50 日迄変化しなかつた。硫酸銅無添加の場合は 3 日後には 400 となり更に日時の経過に伴い増大して硫酸銅添加の場合と同様に 15 日後には最高となり 2,000 であつた。それより後は減少して 25 日後より 50 日迄 400 であつた。I. V. は 3 日後迄は急激に減少して 367.60 より 303.20 となりそれより 10 日目迄の間の減少は緩慢であつたがそれより後は再び急激な減少を示し 30 日後には 211.03 となつた。P. O. V. は他の脂肪酸メチールエステルに於ける

Table 4. Antibiotic aciton of methyl clupanodonate.

Days (Temp. 30°)		0	3	5	10	15	20	25	30	50
Iodine value		367.60	303.20	300.89	298.28	286.81	264.02	248.06	211.03	——
Peroxide value		0	10.85	23.35	35.00	61.27	100.90	144.93	286.04	——
Antibiotic activity $CuSO_4$	5×10^{-4}M	2,000—	2,000—	4,000—	4,000—	10,000—	4,000—	1,333—	1,333—	1,333—
	None	200±	400—	400—	1000—	2000—	1000—	400—	400—	400—

場合と同様に抗菌力とは無関係に増加し 30 日後には 286.04 であつた。

II 鰯酸メチール及びリノレン酸メチールの抗菌作用に対する植物油の阻害作用。

上記の実験により不飽和脂肪酸メチールエステルには日時の経過に伴い硫酸銅を添加しなくても抗菌作用が出現し，その抗菌力は不飽和度の高い脂肪酸程強力であることを知つた。この抗菌作用も第2報に報告した硫酸銅添加による不飽和脂肪酸メチールの抗菌作用の如く，植物油により阻害されるか否かを試験した。

供試不飽和脂肪酸メチールとしては 30° に 20 日間放置した鰯酸メチール及び 30° に 25 日間放置したリノレン酸メチールを用いた。これ等2種の脂肪酸メチールエステルをそれぞれ 0.01 g 宛 10 cc のペプトン・ハイダック培地に加えた後胡麻油，亜麻仁油及び鰯油をそれぞれ 0.05 g 宛添加し常法により抗菌力を測定した。その結果は第5表の如くである。

Table 5. Interference of vegetable oils with the antibiotic action of methyl esters.

Oils added	Methyl clupanodonate	Methyl linolenate
Sesame oil	++	++
Linseed oil	+++	+++
Sardine oil	−	−

After methyl clupanodonate had been left at 30° for 20 days, and methyl linolenate at 30° for 25 days, 0.01g of both methyl esters were added to 10cc of Hayduck's media respectively. To these 0.05g of vegetable oils were added in each case.

即ち時日の経過に伴い出現する鰯酸メチール及びリノレン酸メチールの抗菌作用は鰯油によつては阻害されなかつたが胡麻油及び亜麻仁油によつては明かに阻害され，亜麻仁油の阻害作用は胡麻油よりも強力であつた。これ等の点は硫酸銅添加による不飽和脂肪酸メチールの抗菌作用に対する阻害作用の場合と全く同様であつた。

摘　　要

1. オレイン酸メチール，リノール酸メチール，リノレン酸メチール及び鰯酸メチールを 30° に放置して時日の経過に伴う抗菌力並びに沃素価及び過酸化物価の変化を観察した。

2, これ等不飽和脂肪酸メチールは調製後時日の経過に伴い硫酸銅を添加しなくても抗菌作用を示す様になりその抗菌力は二重結合の数の多いもの程大であつた。この抗菌力は硫酸銅添加 (5×10^{-4}M) の場合の抗菌力に比して遙かに弱かつたがこの二つの抗菌力は同一脂肪酸に於ては時日の経過に伴い略平行して変化した。抗菌力の最大は硫酸銅無添加の場合は調製後 15 日の鰯酸メチールで 2,000 であり，硫酸銅添加の場合は同じく調製後 15 日の鰯酸メチールで 10,000 であつた。

3. 抗菌力は初期に於ける沃素価の急激な減少の後に増大し或る時期に最大値を示しそれ以後は減少するがその減少は或る時期に於て止りそれ以後は変化しなかつたが，沃素価は抗菌力が一定値を示すようになつても減少を続けた。過酸化物価は抗菌力とは無関係に増加した。

4. 硫酸銅の添加を俟たずに時日の経過に伴つて生成する不飽和脂肪酸メチールの抗菌作用は硫酸銅の添加により現出する抗菌作用と同様に亜麻仁油及び胡麻油の如き植物油によつて阻害された。

本研究は一部文部省科学研究費に依つて行つた。記して謝意を表する。

文　　献

1) 富安行雄・豊水正道：日水学 **18**, 155；**18**, 263 (1952).

2) R.S. Harris, J.W.M. Funker and N.A. Milas : *J. Bact.*, **23**, 429 (1932).

3) D.H. Wheeler : *Oil and Soap*, **9**, 89 (1932).

魚体成分の抗菌作用に関する研究—V. 塩類添加によるイカ肝油の抗菌作用出現に対する培地組成の影響に就て

富安行雄・豊水正道
（九州大学農学部水産化学教室）

Studies on the Antibiotic Action of Fish Components—V. Influence of the Ingredients of the Medium on the Production of the Antibiotic Action

Yukio Tomiyasu and Masamichi Toyomizu

In order to ascertain the mechanism in producing the antibiotic action of the caramary oil by the addition of salts, the concentration of $CuSO_4$, $FeCl_3$, $Co(NO_3)_2$ and $KMnO_4$ required, has been discussed from the viewpoint of oxidation-reduction potential of the media.

On low rH media which contain reducing suger and KH_2PO_4, ——standard medium (Peptone-Hayduck medium: glucose 50g., peptone 10g., $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3g., KH_2PO_4 1g., agar 20g. and distilled water 1*l*.), standard medium without $MgSO_4$ and fructose medium with KH_2PO_4——the concentration of these salts required was high, and $Co(NO_3)_2$ was not effective. On the contrary on high rH media, ——standard and fructose media without KH_2PO_4 and sucrose media with or without KH_2PO_4 which contained more or less peptone, ——the concentration of them was small and $Co(NO_3)_2$ was also effective. Therefore, it could be assumed that the decrease of oxidizability of the medium would need high concentration of these salts. In these cases, the precipitation caused by the combination of $CuSO_4$ or $FeCl_3$ with peptone and KH_2PO_4 reduced the inhibitory action by these salts alone (without the addition of the calamary oil), but had no influence on the antibiotic action of the calamary oil by adding salts.

魚油と或種の塩類（微量）とを同時に培地中に添加すると抗菌作用を示すことは既に報告した。[1] 魚油又は塩類を単独に添加しても抗菌作用を示さないので，此作用は培地中に於て魚油と塩類とが反応して生ずる抗菌性物質によるものと一応考え得る。強力な抗菌力を有する魚油を得る為には，抗菌作用出現機構を明かにすることが必要である。此目的を以て先ず抗菌作用出現に対する培地組成の影響に就ての実験を行つた。

培地の炭素源としては葡萄糖，果糖及び蔗糖を用いたが，前二者では KH_2PO_4 の有無はイカ肝油（以下単に肝油と記す）の抗菌作用出現に要する添加塩類の濃度と大なる関係を有することを知つた。Warburg & Yabusoe[2] は燐酸塩の存在に於て還元糖が酸化されると述べているが，この反応が培地中に於て行われるならば，還元糖と KH_2PO_4 を含有する培地の酸化還元電位（以下 O.R.P. と略記する）は小であるべきである。Hewitt[3], Allyn & Baldwin[4], Knaysi & Dutky[5] は好気性菌培地の O.R.P. を測定し，又

1953年3月16日受理

食用油は葡萄糖（3%）含有燐酸塩緩衝液（pH 5.4）中の酵母懸濁液の O.R.P. を測定した。著者等は組成を異にする培地の O.R.P. を測定したところ，還元糖と KH_2PO_4 を含有する培地は是等を同時には含有しない培地よりも O.R.P. が小であり，然も此の rH の小さい培地では，肝油の抗菌作用出現に要する添加塩類の濃度は，rH の大きい培地より遙に大であつた。即ち培地の rH と肝油の抗菌作用出現に要する塩類濃度との間には密接な関係があることを明かにしたので，その大要を報告する。

実験及び結果

1) 炭素源として葡萄糖を用いた場合に於ける培地組成の変化がイカ肝油の抗菌作用出現に及ぼす影響

標準培地：Ingredients of the standard medium.

Glucose	50g.,	Peptone	10g.,	KH_2PO_4	1g.,
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3g.,	Agar	20g.,	Distilled water	1l.

この標準培地のペプトン含量を 2.5g とした培地，KH_2PO_4 無添加の培地，$MgSO_4$ 無添加の培地及び葡萄糖含量を 1g とした培地に於て *Debaryomyces membranaefaciens*（以下 *D.m.* と記す）の発育阻止に要する添加塩類の所要濃度を測定した。即ち 10cc の培地に 0.025g のイカ肝油（沃素価 192.17）を添加した場合と無添加の場合とについて Agar streak method により *D.m.* の発育を 30°C, 48 時間完全に阻止するに要する塩類の濃度を測定した。結果は第1表に示す。

Table 1. The concentration of salts required for the production of the antibiotic action of standard media with different ingredients (Calamary oil 0.025g/10cc)

No. of media	1		2	
Media	Standard medium		Peptone 2.5g.	
Salts \ Oil	added	none	added	none
$CuSO_4$	5×10^{-4}M	5×10^{-3}M	7.5×10^{-5}M	2.5×10^{-3}M
$FeCl_3$	2.5×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-3}	5×10^{-3}
$Co(NO_3)_2$	2.5×10^{-3}	5×10^{-3}	7.5×10^{-4}	5×10^{-3}
$KMnO_4$	2.5×10^{-3}	——*	5×10^{-4}	——
Growth of *D.m.* Salts not added	++	+++	++	+++

3		4		5	
KH_2PO_4 none		$MgSO_4$ none		Glucose 1g.	
added	none	added	none	added	none
5×10^{-5}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-3}	2.5×10^{-4}	5×10^{-3}
5×10^{-4}	7.5×10^{-3}	2.5×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
2.5×10^{-4}	5×10^{-3}	2.5×10^{-3}	5×10^{-3}	7.5×10^{-4}	5×10^{-3}
2.5×10^{-5}	——	2.5×10^{-3}	——	7.5×10^{-4}	——
++	+++	++	+++	++	+++

* $KMnO_4$ could not completely inhibit the growth of *D.m.* even when it was added at a concentration of 10^{-2}M to every medium.

即ち標準培地に於ては KH_2PO_4 の有無は肝油の抗菌作用出現に要する添加塩類の濃度に大影響を与え，KH_2PO_4 無添加の培地では標準培地（KH_2PO_4 添加）に於ける場合の $CuSO_4$ では 1/10, $FeCl_3$ では 1/5, $KMnO_4$ では 1/100 であり，又標準培地に於ては無効であつた $Co(NO_3)_2$ も有効であつた。更に KH_2PO_4 含有標準培地に於てはペプトン及び葡萄糖含量の減少は塩類の所要濃度を稍と減少させたが，$MgSO_4$

の有無は全く影響を与えなかつた。

篠原[7]はアスコルビン酸の酸化に於て燐酸塩は銅塩及び鉄塩と結合沈澱して是等金属塩の触媒作用を阻害すると述べている。著者等の寒天を添加した培地では，燐酸塩と金属塩の結合沈澱に基く影響は肝油無添加の場合に $FeCl_3$ に於て僅に現れたにすぎぬが，ペプトンと金属塩との結合沈澱に基く影響は顕著に現れ，ペプトン含量の減少は $CuSO_4$ 及び $FeCl_3$ の所要濃度を明かに小とした。

2） 炭素源として蔗糖及び果糖を用いた場合に於ける培地組成の変化がイカ肝油の抗菌作用出現に及ぼす影響

標準培地の葡萄糖を等量の蔗糖で置換した培地につき，KH_2PO_4 無添加の培地及びペプトン含量を 2.5g とした培地，更に又標準培地の葡萄糖を等量の果糖で置換した培地につき，KH_2PO_4 無添加の培地に於て *D.m.* の発育阻止に必要な添加塩類の濃度は第2表の如くである。

Table 2. The concentration of salts required for the production of the antibiotic action of sucrose and fructose media with different ingredients (Calamary oil 0.025g/10cc)

No. of media	6		7	
Media	Sucrose medium		Sucrose medium KH_2PO_4none	
Oil / Salts	added	none	added	none
$CuSO_4$	5×10^{-5}	5×10^{-3}	5×10^{-5}	5×10^{-3}
$FeCl_3$	5×10^{-4}	1×10^{-2}	5×10^{-4}	5×10^{-3}
$Co(NO_3)_2$	5×10^{-4}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-3}
$KMnO_4$	2.5×10^{-5}	——	2.5×10^{-5}	——
Growth of *D.m.* salts not added	++	+++	++	+++

8		9		10	
Sucrose medium Peptone 2.5g		Fructose medium		Fructose medium KH_2PO_4 none	
added	none	added	none	added	none
2.5×10^{-5}	2.5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-3}	2.5×10^{-5}	5×10^{-3}
5×10^{-4}	5×10^{-3}	2.5×10^{-3}	1×10^{-2}	5×10^{-4}	5×10^{-3}
5×10^{-4}	5×10^{-3}	2.5×10^{-3}	5×10^{-3}	5×10^{-4}	5×10^{-3}
2.5×10^{-5}	——	1×10^{-3}	——	7.5×10^{-5}	——
++	+++	++	+++	++	+++

即ち蔗糖培地に於ては KH_2PO_4 の有無及びペプトン含量の多寡は肝油の抗菌作用出現に要する塩類濃度に影響を与えず，その必要量は KH_2PO_4 無添加の標準培地に於ける場合と全く同じであつたが，肝油無添加の場合にはペプトン含量の減少及び KH_2PO_4 の無添加は $CuSO_4$ 及び $FeCl_3$ の所要濃度を減少せしめた。

即ちペプトン及び KH_2PO_4 の $CuSO_4$ 及び $FeCl_3$ との結合沈澱は肝油無添加の場合（塩類のみによる発育阻止作用）に於ては影響を与え，その所要濃度を増大させるが，塩類添加による肝油の抗菌作用出現に対しては全く影響を与えないことが明かとなつた。

次に果糖培地に於ては KH_2PO_4 の有無は葡萄糖培地に於ける場合と全く同様に肝油の抗菌作用出現に対し顕著な影響を与え，KH_2PO_4 の無添加は添加塩類の所要濃度を減少させた。

即ち肝油の抗菌作用出現に於て KH_2PO_4 の有無は蔗糖培地では添加塩類の所要濃度に影響を与えないが標準培地及び果糖培地では KH_2PO_4 の無添加は塩類の所要濃度を顕著に減少させる。而も是は添加塩類と KH_2PO_4 との結合によるものではない。

3) 培地組成の差異による rH の変化

還元糖を炭素源とした場合に於ける KH_2PO_4 の有無の影響は，還元糖と KH_2PO_4 とによる還元作用に基くのではないかと考え，林・倉沢の方法に準じて THUNBERG のメチレン青法を用いて還元作用を試験したところ，培地と同一濃度の KH_2PO_4 を添加した葡萄糖溶液及び果糖溶液では 30°C, 24 時間後に或程度メチレン青の脱色が認められたが，蔗糖溶液では認められなかつた。仍て上記の培地には KH_2PO_4 と糖類による還元作用の影響を受けている培地と受けていない培地とが在ることは明かである。この還元作用と肝油の抗菌作用出現に於ける添加塩類の濃度との関係を明かにする為に，上記の組成を異にする培地の O.R.P. を測定した。

各培地はコッホ殺菌釜中で 30 分間蒸煮し，30°C に 30 分間放置後 30°C に於て飽和甘汞電極を用いて O.R.P. を測定した。pH はキンヒドロン電極法により測定し，Eh と pH より rH を求めた。その結果は第3表の如くである。

Table 3. rH value of various media (at 30°C)

No. of media	media	Eh	pH	rH
1	Standard medium	0.359	5.24	22.4
2	Standard medium (peptone 2.5g)	0.416	5.01	23.9
3	Standard medium (KH_2PO_4 none)	0.403	5.51	24.5
4	Standard medium ($MgSO_4$ none)	0.359	5.34	22.6
5	Standard medium (glucose 1g)	0.391	5.48	24.0
6	Sucrose medium	0.419	5.30	24.6
7	Sucrose medium (KH_2PO_4 none)	0.403	5.54	24.5
8	Sucrose medium (peptone 1g)	0.434	5.10	24.7
9	Fructose medium	0.361	5.24	22.5
10	Fructose medium (KH_2PO_4 none)	0.400	5.45	24.3

是等の培地は rH の値から3群に分け得る。即ち第1群は還元糖と KH_2PO_4 とによる還元作用の影響が顕著に現れている rH の小さい群で，是に属する培地は標準培地，$MgSO_4$ 無添加の標準培地及び KH_2PO_4 添加の果糖培地であつて rH は 22.4～22.6 であつた。第2群は還元作用の影響の現れていない群で KH_2PO_4 無添加の標準培地及び果糖培地並びに蔗糖培地であつて，蔗糖培地では KH_2PO_4 の有無，ペプトン含量の多寡は rH には殆ど全く関係せず 24.3～24.7 であつた。第3群は是等の中間に属する培地で，ペプトン 2.5g 含の標準培地及び葡萄糖 1g 含の標準培地で rH はそれぞれ 23.9, 24.0 であつた。

培地の rH と肝油の抗菌作用出現に要する添加塩類の濃度との関係を第1～3表より考察すると，rH の小さい第1群の培地では明かに大きい塩類濃度を必要とし，rH の大きい第2群の培地では塩類濃度は小さい。rH が中間にある第3群の培地では塩類濃度も中間である。即ち肝油の抗菌作用出現に要する添加塩類の濃度も3群に分け得る。而も rH の大小と塩類濃度とは全く相反する関係に在る。

上記の結果から培地の酸化性が減少すると肝油の抗菌作用出現に多量の塩類を必要とすることが分る。仍て培地に還元剤を添加すれば抗菌作用は阻害され，又 rH の大きい培地では抗菌作用が増強されることは当然想像され得るが是等の点に就ては後報する。

要　　約

1. 塩類添加による魚油の抗菌作用出現機構を明かにする為に $CuSO_4$, $FeCl_3$, $Co(NO_3)_2$ 及び $KMnO_4$

添加によるイカ肝油の抗菌作用出現に於て上記添加塩類の所要濃度を培地の酸化還元電位的の観点から考察した。

2. 還元糖に KH_2PO_4 を添加した rH の小さい培地すなわち標準培地，$MgSO_4$ 無添加の標準培地及び KH_2PO_4 添加の果糖培地ではイカ肝油の抗菌作用出現に要する添加塩類の濃度は大であり，又 $Co(NO_3)_2$ は有効でなかった。rH の大きい培地即ち KH_2PO_4 無添加の標準培地及び果糖培地並びに蔗糖培地に於ては KH_2PO_4 の有無及びペプトン含量の多寡に無関係に添加塩類濃度は小であり，又 $Co(NO_3)_2$ も有効であった。即ち培地の酸化性の減少は添加塩類の所要濃度を増大させた。

3. KH_2PO_4 及びペプトンと $CuSO_4$，$FeCl_3$ との結合沈澱は肝油無添加の場合即ち塩類のみによる発育阻止作用を阻害したが，イカ肝油の抗菌作用出現に対しては影響を与えなかった。

終稿に当りイカ肝油を分与されたライオン油脂株式会社高橋喬氏に深謝する。本研究費の一部は文部省科学研究費によった。

文　　献

1）富安行雄・豊水正道：本誌 **18**, 155 (1952), **19**, 99 (1953),
2）O. Warburg & M. Yabusoe : *Biochem. Z.*, **148**, 380 (1924).
3）L. F. Hewitt : *Biochem. J.*, **24**, 512 (1930).
4）W. P. Allyn & I. L. Baldwin : *J. Bact.*, **23**, 369 (1932).
5）G. Knaysi & S. R. Dutky : *J. Bact.*, **27**, 109 (1934).
6）角川　富男：東北大理報，**12**, 551 (1938).
7）篠原龜之輔：日化，**61**, 733 (1940), **62**, 123 (1941).
8）林　金雄・倉沢文夫：科学，**18**, 127 (1948).

魚体成分の抗菌作用に関する研究（第Ⅵ報）
魚油の酸化による抗菌作用の出現

富安行雄・豊水正道・高橋喜久雄
（九州大学農学部・水産化学教室）

日本水産学会誌
第十八巻 第十号 別刷
昭和二十八年三月十日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 18, No. 10, Mar. 1953

魚体成分の抗菌作用に関する研究（第Ⅵ報）
魚油の酸化による抗菌作用の出現

富安行雄・豊水正道・高橋喜久雄
（九州大学農学部・水産化学教室）

Studies on the Antibiotic Action of Fish Components. (Part VI). Production of the Antibiotic Action by the Oxidation of Fish Oils.

Yukio TOMIYASU, Masamichi TOYOMIZU and Kikuo TAKAHASHI

We have ascertained that the calamary oil produces the antibiotic action by chemical oxidation. In producing it, Cu-, Co-, Pb-stearate, potassium permanganate, m-nitroaniline and p-nitroaniline act as a catalyst at 100°, and the first three reagents are more suitable than the others. For the production of the antibiotic action of the calamary oil, the most satisfactory condition is to oxidize it at 100° for 1.5～4.5 hours by blowing oxygen into it in the presence of $\frac{M}{100}$ Cu-, Co-, or Pb-stearate.

The antibiotic substance seems to be an unstable intermediate product which peroxide or hydroperoxide yields during the oxidative process. The antibiotic activity, therefore, can be increased by the oxidation of oils possessing higher peroxide value.

さきに著者等は Pepton-Hayduck 培地に硫酸銅を 5×10^{-4}M になる如く添加して高度不飽和脂肪酸を含有する魚油例えば鰮油を加えると鰮油の稀釈度1,000倍で *Debaryomyces membranefaciens* の発育を完全に阻止する（抗菌力1,000）という新知見を得，是は高度不飽和脂肪酸が培地中に於て変化することにより抗菌作用が出現すると考え，此の機構に就て研究し魚油の酸化に基くと推論した。

本報ではより強力な抗菌性魚油を得る為には魚油の酸化と抗菌作用との関係を明かにすることが必要であると考え下記の如き実験をした。

Table 1. Effect of $CuSO_4$ and Cu-stearate on the production of the antibiotic action of the calamary oil (at 100° for 1.5 hrs.).

Conc. (M)	10^{-1}	5×10^{-2}	10^{-2}	5×10^{-3}
$CuSO_4$	133	100	100>	100>
Cu-stearate	200	133	133	100

Table 2. Influence of the temperature upon the production of the antibiotic action of the calamary oil in the presence of $\frac{M}{10}$ Cu-stearate (for 1.5 hrs.).

Temp.	200°	150°	100°	60°
Cu-stearate	200	200	200	133

供試魚油としては精製したイカ肝油を用い，是に粉末の硫酸銅及びステアリン酸銅を10^{-1}M，5×10^{-2}M，10^{-2}M 及び 5×10^{-3}M になる如く添加して100°に於て1.5時間加熱して酸化し抗菌力を測定したところ第1表に示す如くステアリン酸銅の添加は硫酸銅より勝るが抗菌力は共に小である。是は酸化温度が適温でないことに原因すると考えステアリン酸銅を10^{-1}Mになる如く添加した試料を200°，150°，100°及び60°に於て1.5時間加熱して酸化を行い抗菌力を測定したが第2表に示す如く100°～200°に於てはこの時間内では温度の影響は全く認められず抗菌力は増強されなかつた。即ちイカ肝油をステアリン酸銅

の存在の下に加熱酸化するのみでは強力な抗菌作用を出現させ得ない。

野中等[1]及び小幡等[2]は魚油の油焼特に着色は窒素化合物に原因すると述べている。著者等は油焼の現象と抗菌作用との間に関係があるのではないかと考え 10^{-1}Mになる如くステアリン酸銅を添加した試料にアンモニアを吹込んで100°に於て30分間反応させ褐色不透明な油焼した油を得，是に就て抗菌力を測定したが窒素化合物の影響は表われず抗菌力は増大しなかつた。又東等[3]は腐敗魚体が酵母の発育を阻止するのは揮発酸によると述べ，著者等も腐敗魚から得た魚油が微生物の発育を阻止することを屢々経験しているのでステアリン酸銅を添加したイカ肝油に醋酸又は蟻酸を通じて100°に於て30分間反応させたが抗菌力には影響を与えなかつた。

次にステアリン酸銅を10^{-2}M添加した試料の酸化を促進させる為に乾燥酸素を吹込み100°に於て酸化したところ油の沃素価は顕著に低下し酸化が行われ然も抗菌力は増強したので，この抗菌作用が酸化に基くか否かを確める為にステアリン酸銅無添加の試料を酸素吹込み下及び酸化されない状態即ち排気下(25mm Hg)，窒素吹込み下に100°に於て9時間反応させ一定時間毎に沃素価（以下I. V.と略記する），過酸化物価（以下P. O. V.と略記する）及び抗菌力の変化を測定した。その結果は第1図及び第3表に示す如く酸化しない試料では抗菌作用は殆ど全く出現しないが，酸化した試料即ち酸素吹込み下で加熱したもの及びステアリン酸銅を添加し更に酸素吹込み下で加熱した試料では明かに抗菌作用が表われ然も酸化の進んだ後者の抗菌力は大であつた。

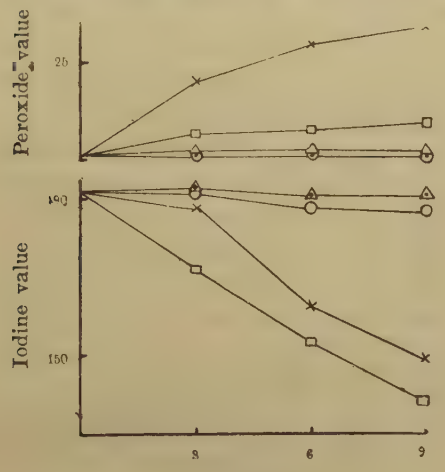


Fig. 1. Oxidation of calamary oil by thermal treatments under various conditions (at 100°).
- • Heating under vacuum (25mm Hg).
- ○ Heating under nitrogen-blowing.
- △ Atmospheric oxidation.
- × Oxidation by blowing oxygen.
- □ Oxidation by blowing oxygen in the presenceof $\frac{M}{100}$ Cu-stearate.

是等の実験によりイカ肝油は酸化により抗菌作用を出現することは明かであるが酸化による抗菌作用の出現に於て酸化条件と抗菌力との関係を明かにするために酸化剤の添加，酸化温度及び酸化剤の濃度等が抗菌作用の出現に如何なる影響を与えるかに就て検討を試みたのでその大要を報告する。

實 驗 方 法

供試魚油：Pepton-Hayduck 培地では硫酸銅の濃度が5×10^{-4}M で1,000の抗菌力を有するが，硫酸銅無添加では殆ど全く抗菌作用を示さない高度不飽和脂肪酸を含有するイカ肝油（I.V.191.94，P.O.V.I.03）を用いた。

酸化劑：銅，コバルト及び鉛のステアリン酸塩，過マンガン酸加里及び田中等[4]が強力な酸化剤であると提唱している m-Nitroaniline 及び p-Nitroaniline を用いた。一般に金

Table 3. Production of the antibiotic action by the oxidation of the calamary oil (at 100°).

Reactive condition \ Time in hrs.	1.5	3	6	9
Heating under vacuum(25 mm.Hg)	20>	20>	20>	20>
Heating under nitroge-nblowing	20>	20>	20>	20>
Atmospheric oxidation	20>	20>	20>	20>
Oxidation by blowing oxygen	20	200	200	200
Oxidation by blowing oxygen in the presence of $\frac{M}{100}$ Cu-stearate	1,000	1,000	400	200

属を酸化剤として脂肪鹸塩とする際はオレイン酸塩として用いるがオレイン酸は微生物の発育に於てBiotinの作用をなすことがある[5]のでステアリン酸塩とした。上記ステアリン酸塩の調製はHARMAN & WAGNER[6]のオレイン酸コバルト調製法に準じて行つた。

酸化方法：反応容器としては大型試験管（3×15 cm）を用い，40 cの供試イカ肝油に所要濃度の酸化剤を添加し一定温度のパラフィン浴中で毎時8 *l* の乾燥酸素を吹込んで酸化した。

抗菌力の検定法：Agar streak method により *Debaryomyces membranaefaciens* の発育を30°，48時間完全に阻止するに要する供試イカ肝油の最小稀釈倍数を以て抗菌力とする。

實 驗 結 果

1. 酸化劑の効果　上記6種の酸化剤を 10^{-2}Mになる如く添加した試料及び酸化剤無添加の試料を20°及び100°に於て酸素を吹込み9時間酸化して一定時間毎にI.V.，P.O.V.及び抗菌力の変化を測定し酸化剤添加の効果を検討した。その結果は第2図及び第4表に示す如く上記の酸化剤の添加は100°に於ては孰れも有効で抗菌力を増大させている。銅，コバルト及び鉛のステアリン酸塩及び過マンガン酸加里の添加は抗菌力を速かに増大し1.5時間後には1,000となり対照の20に比して遙に大きい値を示したが6時間後には生成した抗菌性物質が破壊されるらしく抗菌力は低下した。m-Nitroaniline及びp-Nitroanilineの添加は100°に於ても上記4種の酸化剤の添加よりも抗菌性物質の生成が緩漫ではあるが抗菌力は徐々に増大して9時間後には1,000となつた。20°に於ては銅塩，

Table 4.　Effect of the catalyst on the production of the antibiotic action of the calamary oil.

Catalyst ($\frac{M}{100}$)	Hrs. / Temp.	1.5	3	4.5	6	7.5	9
Cu-stearate	100°	1,000	1,000	1,000	400	200	200
	20°	——	200	——	400	——	400
Co-stearate	100°	1,000	1,000	1,000	400	200	200
	20°	——	113	——	400	——	400
Pb-stearate	100°	1,000	1,000	1,000	1,000	400	200
	20°	——	113	——	200	——	400
$KMnO_4$	100°	1,000	1,000	1,000	200	200	200
	20°	——	20>	——	20>	——	20>
m-Nitroaniline	100°	20	100	200	200	200	1,000
	20°	——	20>	——	20>	——	20>
p-Nitroaniline	100°	20	40	200	400	400	1,000
	20°	——	20>	——	20>	——	20>
Control	100°	20	200	200	200	200	200
	20°	——	20>	——	20>	——	20>

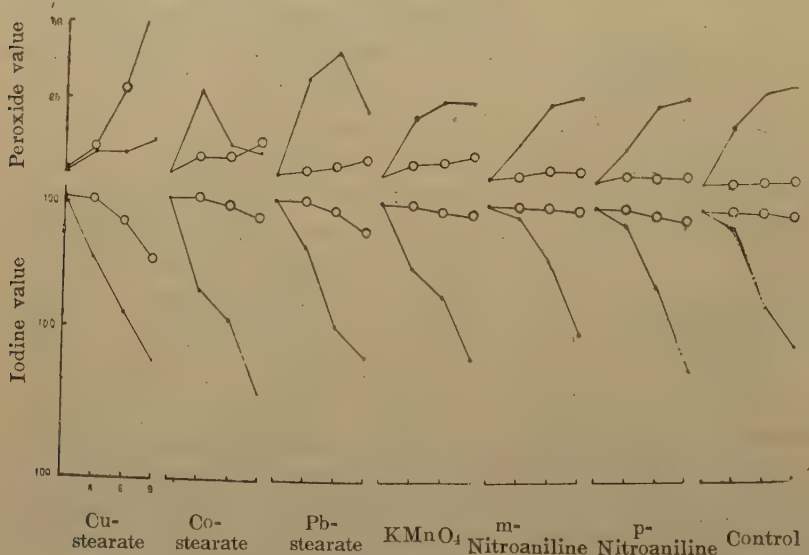


Fig. 2.　Oxidation of calamary oil in the presence of the catalyst ($\frac{M}{100}$).
○—20°　●—100°

コバルト塩及び鉛塩を添加した試料ではI.V.及びP.O.V.の変化が表われ明かに酸化され抗菌作用は時間の経過と共に増大したが，I.V.及びP.O.V.の変化が殆ど認められない。即ち酸化されない対照，過マンガン酸加里，m-Nitroaniline 及び p-Nitroaniline を添加した試料では総て9時間後に於ても抗菌作用は殆ど全く出現しなかつた。

2. 酸化温度

ステアリン銅及び過マンガン酸加里を10^{-2}Mになる如く添加した試料及び酸化剤無添加の試料に酸素を吹込み20°，50°，80°，100° 及び 150° に於て酸化を行い抗菌作用出現の適温を試験した。その結果は第3図及び第5表に示す如くである。即ちI.V.の減少は温度の高い程著しいがP.O.V.の増加は必しも温度とは比例していない。是は生成する過酸化物が熱により分解する為で中村[7]は大豆油を酸化して生ずる過酸化物に就て酸化剤の添加は過酸化物生成の適温を低下させ又分解温度をも低下させると述べているが著者等の実験に於てもその傾向が明かに表われている。油の酸化による生成物は温度により異る事が報告されている[8]。著者等の実験結果によると20°及び50°に於てはステアリン酸銅を添加した試料にのみ抗菌作用が表われ，過マンガン酸加里を添加した試料及び酸化剤無添加の試料では殆ど全く表われなかつた。80°に於ては熟れの試料でも相当大きな抗菌作用が表われ，100°に於て最大であつたが，150°に於てはI.V.の低下は最も著しいにも拘らず抗菌力は減少した。過マンガン加里の抗菌作用出現効果は100°に於てはステアリン酸銅と等しいが他の温度では劣つている。即ち抗菌作用出現に対する酸化温度は100°が最良である。

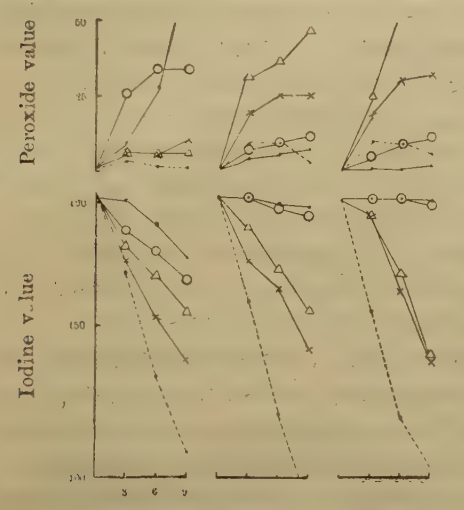


Fig. 3. Oxidation of calamary oil at several degrees of temperature ($\frac{M}{100}$).
•—20°, ○—50°, △—80°, ×—100°, ·····150°

3. 酸化剤の濃度

イカ肝油の酸化による抗菌作用出現に於て酸化剤として銅，コバルト及び鉛のステアリン酸塩が過マンガン酸加里，m-Nitroaniline 及び p-Nitroaniline よりも遙に勝つていることを確め得たので上記3種の酸化剤の添加により強力な抗菌性油を得る為の添加適量を知る為に酸化剤の濃度の影響を試験した。酸化剤を$\frac{1}{5}\times10^{-1}$M，10^{-2}M及び$\frac{1}{5}\times10^{-2}$Mになる如く添加した試料を酸化適温の100°に於て酸素吹込み下で酸化し抗

Table 5. Influence of the oxidative temperature upon the production of the antibiotic action of the calamary oil.

Catalyst ($\frac{N}{100}$)	Cu-stearate						$KMnO_4$						Control					
Hrs. / Tem.	1.5	3	4.5	6	9		1.5	3	4.5	6	9		1.5	3	4.5	6	9	
20	—	200	—	400	400		—	20>	—	20>	20>		—	20>	—	20>	20>	
50	200	400	400	400	400		20>	20>	20>	20>	20>		20>	20>	20>	20>	20>	
80	400	1,000	400	400	200		20>	400	400	200	200		20>	200	200	200	200	
100	1,000	1,000	1,000	400	200		1,000	1,000	1,000	200	200		20	200	200	200	200	
150	400	1,000	200	133	20		200	100	100	100	20		133	200	133	40	20	

Table 6. Influence of the concentration of the catalyst upon the production of the antibiotic action of the calamary oil. (at 100°)

Catalyst	Cu-stearate					Co-stearate					pb-stearate				
Conc. of catalyst (M) \ hrs.	1.5	3	4.5	6	9	1.5	3	4.5	6	9	1.5	3	4.5	6	9
$\frac{1}{5}\times10^{-1}$	400	400	400	400	200	400	400	200	200	200	400	400	200	200	133
10^{-2}	1,000	1,000	1,000	400	200	1,000	1,000	1,000	400	200	1,000	1,000	1,000	1,000	200
$\frac{1}{5}\times10^{-2}$	133	400	400	400	400	200	400	400	400	400	200	400	400	400	133

菌力を測定した。その結果は第6表に示す如く10^{-2}Mが最良の条件であつた。即ち，$\frac{1}{5}\times10^{-2}$Mでは酸化剤の濃度が過小で9時間後でも抗菌力は1,000とならず又$\frac{1}{5}\times10^{-1}$Mでは過大で3時間後に400であり，それより後は増加しなかつた。

考　　察

イカ肝油は酸化により抗菌作用を出現するようになる。酸化剤としてステアリン酸銅を添加して100°に於て酸化したのみでは抗菌作用は小であるが是に酸素を吹込んで酸化すると抗菌作用が大となる。然し6時間以上加熱すると抗菌性物質は分解するらしく抗菌力は減少し，又150°に於ける酸化ではI.V. の低下は100° に於ける酸化よりも顕著であるにも拘らず抗菌力は小である。一方酸化剤の濃度は銅，コバルト及び鉛のステアリン酸塩では10^{-2}Mが最適であつて是より高濃度でも低濃度でも抗菌力は小である。是等の結果より考えると抗菌性物質はイカ肝油の酸化により生成するが，酸化が進めば進む程その生成が大になるというのではなく，酸化の条件如何によつては生成が減少するか又は分解するようである。即ち抗菌性物質は酸化の或る過程に於て生産される不安定な中間生成物であると思われる。

原田[9] はオリーブ油をオゾン化して，STEVENS[10] は魚油を紫外線照射してそれぞれ抗菌性油を得て共に抗菌力は P.O.V. と関係があると述べ，又最近 ZUKERMAN[11] はオレンヂの皮に含まれオレンヂ精油の90%以上を占めている d-limonene の微生物の発育に対する影響を研究し，新しく蒸溜した d-limonene は発育阻止作用を示さないが空気中に露出して酸化すると抗菌作用が表われ，この作用は過酸化物によると推定した。即ち前記諸氏は酸化油の抗菌作用は過酸化物に基くものと考えている。

最近の研究によると油の酸素による酸化は過酸化物及びヒドロ過酸化物を通つて進行するといわれている[12)-15)] が，著者等の結果ではイカ肝油の酸化による抗菌作用は P.O.V. とは直接の関連は認められないので抗菌性物質は過酸化物或はヒドロ過酸化物とは考えられず，是等が変化して生ずる不安定な中間生成物と考えるのが妥当であらう。

抗菌性物質が過酸化物或はヒドロ過酸化物から変化して生ずるものであるならば P.O.V. の大きい試料を抗菌性物質生産の最適条件で更に酸化すると抗菌力が増強することは当然考えられるので P.O.V. の大きい試料即ち酸化剤無添加で80°に於て6時間酸化した試料，及びステアリン酸銅を10^{-2}Mになる如く添加して50°に於て4.5時間酸化した試料をステアリン酸銅の濃度10^{-2}Mで100°に於てそれぞれ再び酸化して P.O.V. 及び抗菌力の変化を測定した。その結果は第7表に示す如く，P.O.V. は再酸化30分後急激に低下し，是に伴つて抗菌力は急激に増強して1,333となつている。此の結果によつても抗菌性物質は過酸化物或はヒドロ過酸化物より変化して生ずるものと考えられる。

Table 7. Increase of the antibiotic activity by repeated oxidation.

Oxidative process	Time in hrs. after first oxidation	peroxide value	Antibiotic activity
After the calamary oil had been oxidized at 80° for 6 hours, the oxidation was repeated in the presence of $\frac{M}{100}$ Cu-stearate at 100°.	0	57.7	200
	0.5	4.0	1,333
	3	7.0	1,333
	6	8.0	1,000
After the calamary oil had been oxidized at 50° for 4.5 hours in the presence of $\frac{M}{100}$ Cu-stearate, the oxidation was repeated at 100°.	0	33.0	400
	0.5	2.8	1,333
	3	9.4	1,333
	6	9.6	1,000

總　　括

1. イカ肝油は酸化により抗菌作用を出現することを確めた。
2. 抗菌作用の出現に於て銅，コバルト及び鉛のステアリン酸塩，過マンガン酸加里，m-Nitroaniline及び p-Nitroaniline は100°に於ては触媒作用をなし，前3者の効果は他より勝れている。
3. イカ肝油に銅，コバルト或は鉛のステアリン酸塩を 10^{-2}M添加し100°に於て酸素吹込み下で1.5～4.5時間酸化するのが抗菌作用出現の満足すべき条件である。
4. 抗菌性物質は酸化過程に於て過酸化物又はヒドロ過酸化物が変化して生ずる不安定な中間生成物である。仍て過酸化物価の大きい試料を酸化することにより抗菌作用を増強せしめ得る。

終稿に当りイカ肝油を分与されたライオン油脂株式会社の高橋喬氏に深謝する。本研究費の一部は文部省科学研究費によつた。

文　　献

1) 野中順三九・西塘清見：日水誌，**15**，267 (1949).
2) 小幡彌太郎・星勝之助・松野宏一：日水誌，**15**，412 (1949).
3) 東秀雄・岡田稔・山田充阿彌：日水誌，**16**，443 (1951).
4) 田中芳雄・中村三男：工化，**34**，1044 (1931).
5) E. Kodick : Symposia of the Society for Experimental Biology, III, 226 (1949).
6) J. Hyman & C. R. Wagner : J. Am. Chem. Soc., **53**，3019 (1931).
7) 中村三男：工化，**40**，442 (1937).
8) A. W. Ralstom : Fatty Acids and Derivatives, 918 (1948).
9) T. Harada : Bull. Chem. Soc. Japan, **9**，192 (1934).
10) F. A. Stevens : J. Bact., **32**，46 (1936).
11) I. Zukerman : Nature, **168**，517 (1951).
12) S. Bergstorm : Nature, **156**，717 (1945).
13) P. S. Hess & G. A. Ohare : Ind. Eng. Chem., **42**，1424 (1950).
14) 増尾富士雄：化学の領域，**6**，2 (1952).
15) 小方芳郎：化学の領域，**6**，163 (1952).

抗菌性魚油による漁網の防腐試験（豫報）

富安行雄・豊水正道
（九州大学農学部水産化学教室）

On the Preservation Test of Fish Net by Antibiotic Fish Oils (Preliminary Report)

Yukio Tomiyasu and Masamichi Toyomizu

日本水産学会誌
第十九巻 第四号 別刷
昭和二十八年八月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the japanese Society of Scientific Fisherics
Vol. 19, No. 8, August. 1953

抗菌性魚油による漁網の防腐試験（豫報）

富安行雄・豊水正道
（九州大学農学部水産化学教室）

On the Preservation Test of Fish Net by Antibiotic Fish Oils (Preliminary Report)

Yukio Tomiyasu and Masamichi Toyomizu

The antibiotic sardine oil, which was prepared by adding M/10 Cu-stearate or by blowing oxygen at 100°C in the presence of M/100 Co-stearate or m-nitroaniline to the oil, was utilized in the treatment of netting cord.

Some effects on the preservation were recognized (Fig. 1, 2), but further studies on the dilution reagents of dye and on the drying of net are required to obtain satisfactory result.

漁網の防腐剤として脂肪酸の銅塩を用いる試みは古くから行われている[1-3]。然し是等は孰れも銅塩のみの作用を利用するために比較的高濃度を必要とする。

著者等は魚油に微量の銅塩を添加すると抗菌作用が出現し，是は魚油中の不飽和脂肪酸に基くもので，且つ不飽和度の大なるもの程抗菌力が大であることを究明したので[4] この原理を応用した。

試　験　I

供試網絲：綿絲 20 番手。

試 験 地：千葉県館山市東京水産大学実習場桟橋沖。

試験期間：昭和 26 年7月 23 日より 10 月 11 日迄（80 日間）。

染付方法：1. ステアリン酸銅を M/10 になる如く添加した鰯油（沃素価 162.0）で 80°C に於て 30 分間染付。2. 硫酸銅を M/10 になる如く添加した鰯油で 80°C に於て 30 分間染付。3. 鰯油で 80°C に於て 30 分間染付。4. カツチ染後重クロム酸加里及び硫酸銅溶液で固定。5. 無処理素絲。

結　果：上記5種の綿絲の海水浸漬中の抗張力の変化を測定した結果を第1図に示す。ステアリン酸銅を M/10 になる如く添加した鰯油で染付た綿絲はカッチ染付よりも勝れているが鰯油のみ及びステアリン酸銅の代りに硫酸銅を添加した鰯油で染付けたものは共に防腐効果が小であつた。

本染料に於てステアリン酸銅の所要濃度を決定する為にステアリン酸銅を M/100, M/10 及び M/2 になる如く添加した鰯油の防腐効果を実験室に於て恒温器中に 25°C に保つた海水中で浸漬試験した結果上記3種の濃度では抗張力の変化の差異は認められなかつた。

試　験　II

試験Iに用いた染料は乾燥が悪い欠点があり且つ魚油に銅塩を添加して出現する抗菌作用は魚油の酸化に基くことを知つたので鰯油に酸化剤を添加して乾燥酸素を吹込み酸化する方法[5] を用いた。

供試網絲：試験地：試験Iと同じ。

試験期間：昭和 27 年6月 30 日より9月 28 日迄（90 日間）。

1953 年3月 30 日受理（印刷費負担）

染付方法：1. 鰮油（沃素価 179.8）に M/100 になる如くステアリン酸コバルトを添加し 100°C のパラフィン浴中で乾燥酸素を吹込み9時間反応させたものをアセトンで3倍に稀釈した染料で室温に於て 12 時間染付。2. m-Nitroaniline をステアリン酸コバルトの代りに用い1と同様に処理。3. 1, 2 の染料を等量に混合した料で染付。4. カツチ染付後重クロム酸加里及び硫酸銅溶液で固定。5. 無処理素絲。

結　果：海水浸漬中の抗張力の変化は第2図に示す如く上記 3 種の染料の防腐効果は小であつてカツチ染料に劣り，最も勝れた混合染料でも 70 日間しか有効でなかつた。是はアセトンを用いて稀釈したため防腐効果が弱まつたものと思われる。

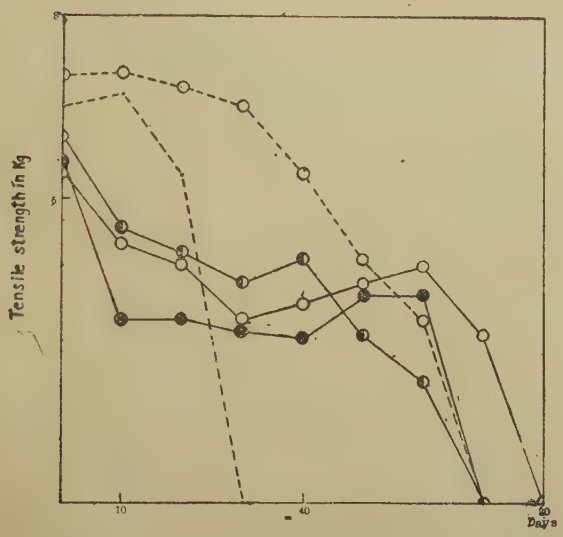


Fig. 1 Changes of tensile strength of cotton lines in the sea.
○—— Sardine oil containing M/10 Cu-stearate.
●—— Sardine oil containing M/10 $CuSO_4$.
◐—— Sardine oil.
○- - - Cutch (fixed with $K_2Cr_2O_7$ and $CuSo_4$).
•- - - Untreated.

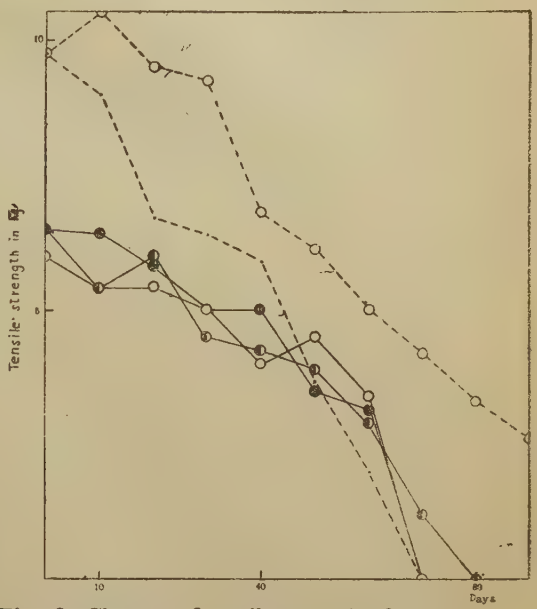


Fig. 2 Changes of tensile strength of cotton lines in the sea.
○—— Sardine oil (1) oxidized by blowing oxygen at 100°C in the presence of M/100 Co-strearate and diluted to 1/3 with acetone.
●—— Sardine oil (2) oxidized by blowing oxygen at 100°C in the presence of M/100 m-nitroaniline and diluted to 1/3 with acetone.
◐—— Mixture of (1) and (2).
○- - - Cutch (fixed with $K_2Cr_2O_7$ and $CuSO_4$)
•- - - Untreated.

本研究費の一部は文部省科学研究費（代表者田内教授）によつた。又抗張力の測定は東京水産大学岡田研究室の方々を煩わした。記して謝意を表する。

文　献

1) W. R. G. Atkins: J. *Marine Biol. Assoc.*, **15**, 219 (1928); **20**, 627 (1936).
2) A. C. Robertson: *Ind. Eng. Chem.*, **23**, 1093 (1931).
3) 村田正雄：工化，**38**, 971 (1934).
4) 富安行雄・豊水正道：日水誌，**18**, 155 (1952).
5) 富安行雄・豊水正道・高橋喜久雄：日水誌，**18**, 530 (1953).

二枚貝の開閉殻運動に関する力学的考察 (第1報)

蝶番軸に就て

三宅正人

Studies on the mechanism of the opening and closing movement of bivalves. 1. On the hinge axis

Masato Miyake

九州大學農學部學藝雜誌 第十二卷 第二號 別刷
Reprinted from the Science Bulletin, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Vol. 12, No. 2, August, 1951

二枚貝の開閉殻運動に関する力学的考察（第1報）

蝶番軸に就て

三宅正人

Studies on the mechanism of the opening and closing movement of bivalves. 1. On the hinge axis

Masato Miyake

I. 緒言

二枚貝の開閉殻運動は閉殻筋及び蝶番軸にある靱帯によつて行われている．閉殻筋に就てはカキ，ホタテガイ等は殻のほぼ中心に1個を有するが，アサリ，ハマグリ，シオフキ等は殻の前後に各々1個宛計2個を有している．又靱帯に就ては構造上，形態上から色々の種類が挙げられる．

何れにせよ此の両者の相互作用によつて開閉殻運動が行われるのであるが，此の開殻力及び閉殻力は非常に大きいもので古来注目されて来た所であるにも拘らずその力を計測した人は少く閉殻筋の張力に就ては Vaillant[1]，Plateau[2]，Marceau[3,4]，田村[5] 等，又靱帯の開殻力に就ては Plateau[2]，Bayliss, Boyland & Ritchie[6]，田村[5,7] 等の諸氏によつて研究されているに過ぎない．之等の報告の内 Marceau[4] によつて明らかにされた閉殻筋の力を第1表に示す．

第1表：各種二枚貝閉殻筋の最高張力（kg/cm²）(Marceau, 1909).

貝名	平滑筋	横紋筋
Anodonta cygnea	5.2	2.0
Ostrea edulis	12.0	0.5
Tapes decussatus	12.6	1.0
Cardium edule	25.0	1.2
Pecten maximus	8.5	—

又 Bayliss, Boyland & Ritchie[6] 及び田村[7] により示された靱帯の力は第2表の如くである．

第2表：靱帯の最高張力 (kg/cm^2).

Pecten magellanicus	0.3～0.5	Bayliss, Boyland & Ritchie (1930)
Chama imbricata Broderip	0.011	田村（1931）
Paphia (*Ruditapes*) *variegata* (Sowerby)	1.151	田村（1931）

又田村[5]の実験によるとイワガキ閉殻筋の張力は7～9 kg/cm^2 を示しているが，若し人間の腕の筋肉がイワガキの筋肉と同性質のものと仮定すると約1/4噸の重量を片手にブラ下げて平気であるのみかその重量を数日間上下していることが出来る計算になると言われる[8]．

上に示したような大きい力が働いている開閉殻運動には当然合理的な力の配置が行われておらねばならない．

然るに此の問題に就て注目し研究した人は甚だ少く Coutance[9] 以来 Marceau[10] に至る迄3，4人の人々に過ぎない．殊に我国では全く研究されたことがなく，又紹介された文献もない状態である．

著者は二枚貝の化学的開殻法，即ち化学的に貝を処理して貝より剝身を簡易に大量採取しようとする方法を研究中，二枚貝の開閉殻運動に於ける力の配置に興味を持ち若干研究したので之等の文献を紹介すると共に之等の研究者が解明出来なかつた問題及び触れなかつた問題等に就て明らかにすることの出来た結果を順次報告する次第であるが，本報に於ては開閉殻運動の中心となる蝶番軸に就て観察した結果を述べる．

本論文を草するに当り終始御懇篤な御指導を賜つた恩師富安教授，有益な御助言を賜つた水産生物学教室の内田教授及び塚原学士，理学部物理学教室の原島鮮教授に厚く謝意を表する．又実験に協力された実藤久光氏に謝意を表する．

II. 蝶番軸の測定

二枚貝の開閉殻運動の力学を論ずるには先づその運動の中心となる蝶番軸に就て知らねばならない．著者はこの目的を以て数種の二枚貝に就てその蝶番軸の測定を行つた所，或種の双柱類では之が常に固定したものではなく変動性のものであることを見出した．1906年 Marceau[11] が二枚貝の内には開閉殻運動の時貝の前後に於ける殻間の距離が異なるもののあることを認め之を "Le mouvement de bascule" と名付け之は生活機能上合理的であることを認めた．此の運動は一面観方を変え力学的に見ると著者の言うような可変性蝶番軸を持つ貝に起る現象と言い得るのである．著者は之に力学的の解明を与え靱帯及び閉殻筋の機能が之を可能ならしめるものであつて，又之は貝の生活によく適合した機構であること等を明らかにした．

なお貝殻のような曲面を持つた目的物を写生するのに適した方法[12]を考案し之等実験の発展を容易ならしめることが出来た．

A. 貝の写生方法

生物学実験に於て被写生物を写生するのに2，3の方法がある．被写生物が平面の場合は写眞機によるのが最も適当している．然し被写生物が不鮮明であつたり凹凸のあるもの

を近距離から撮るのは不適当である．万能転写器とか大島[13]により紹介された方法は簡単な原理ではあるが不正確であり且つ操作上疲れ易い．

貝のように曲面を持つた凹凸のある被写生物を正確に写生する為には無限大の距離から之を写生しなければならない（之は殊に此の報告のような場合重要なことであるが章の進むに従つて諒解されることと思う），又操作が簡単でなければならない．此の目的の為著者は簡易な一原寸写生法を考案したのであるがその詳細に就ては同報告[12]を参照され度い．

B．蝶番軸の測定法

先づ蝶番軸の構造に就て若干の説明を加えるのが至当と思われるが後文中の実験例に於てその各々に就て詳細に述べてあるから茲では省略する．

アカガイ，コケガラス，タイラギ等のように蝶番軸が一直線に固定しているものは測定する迄もないが，アサリ，ハマグリ，カガミガイ，カキ等は多少曲つた靱帯を有し蝶番の線はどこにあるか分らない．又シオフキ，ホタテガイ，イタヤガイのように柱状の内靱帯を有するものも同様である．

此の場合2枚の貝殻の相接触する線は平面を構成するので2枚の殻は蝶番軸を中心として廻転する2枚の平板と考えることが出来る．従つて蝶番軸の測定には次のような方法が考えられる．即ち (i) Fig. 1, a, b に於て開殻した貝殻の間隔がA点とP点に於て同一であつたとすれば蝶番軸は AP に平行な直線でなければならない．然しカキのように凹凸のある縁を持つた殻では同じ間隔を持つた A, P 両点を求めることは困難なのでこの測定法を少し変更せねばならない．

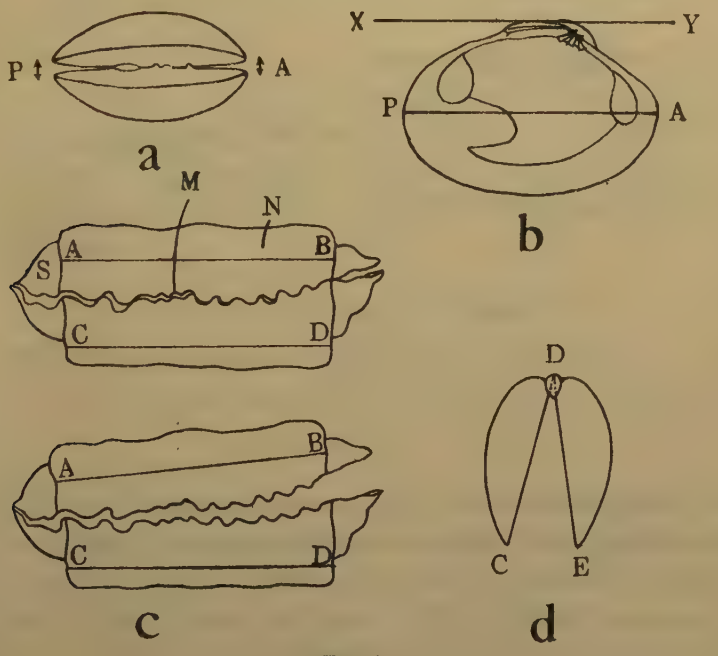


Fig. 1.

M…殻縁．S…カキ殻．

その為には Fig. 1, c に示すように粘土のような可塑物（N）を閉ぢた殻の上に成型し，任意に AB と CD の二平行線を引いて置けば，開殻した場合左右殻の間隔は此の2直線 AB と CD との間隔の増加距離を以て置き換えることが出来るから前と同じ方法で測定を行い得る．(ii) Fig. 1, b の AP 線に直角の殻の前後方向から両殻を見た場合 Fig. 1, d に示すように殻縁の延長線は CD と ED の如く一点Dに於て交る可きである．以上の2方法により蝶番軸 XY を定めることが出来る(Fig. 1, b).

C. 実 驗 結 果

イタボガキ Ostrea denselamellosa Lischke (1949年2月博多湾産)

蝶番軸は生きている時も又閉殻筋をナイフで切断した時も同一で Fig. 2, a に示すように内靱帯の方向 XY と一致することが分つた．

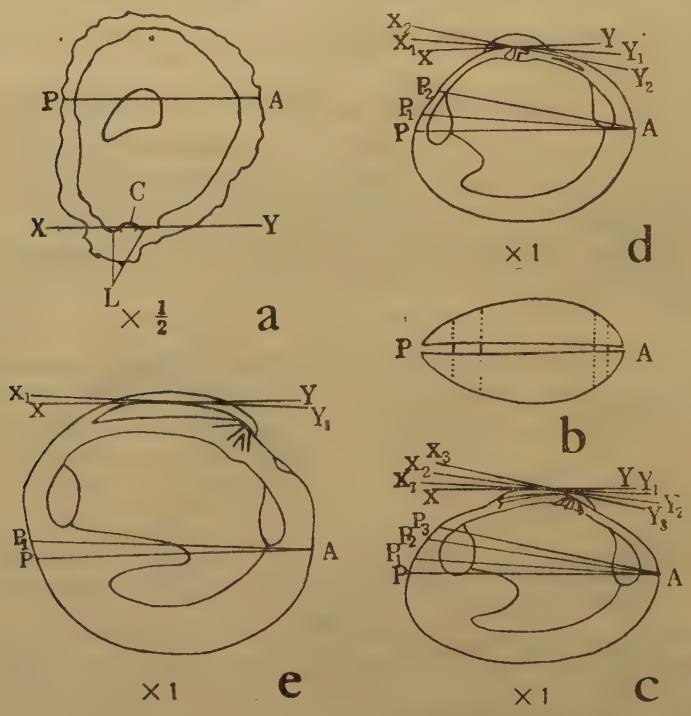


Fig. 2.
a イタボガキ.　b, c アサリ.
d シオフキ.　e カガミガイ.

アサリ *Paphia philippinarum* (Adams et Reeve) (1949年2月有明海産)

i). 閉殻筋を切断し靱帯の作用のみ受けて開殻した場合の蝶番軸 XY は Fig. 1, b のように一般にそれと考えられている線と大体一致する　ii) 自然の状態では（i）と異なり生きている貝をよく観察すると Fig. 2, b のように前部より後部の方が広く開殻していることが認められる．即ち（i）の場合同じ間隔を持つ A, P 両点は，此の場合異なるのであつてP点ではA点に於けるよりも大きく開いている．此の現象は Anthony[14] 及び

Marceau[11] により認められ "Le mouvement de bascule" と呼ばれたものである．後部が前部より大きく開く為には蝶番軸は Fig. 2, c に示す X_1 Y_1, X_2 Y_2, X_3 Y_3 のように XY より多少傾いて存在せねばならない．P_1 A は PA の測定の時と同じ方法で生きている貝で最も大きく開殻した場合測定したものである．従つて此の場合の蝶番軸は P_1A に平行な X_1 Y_1 となるが之は XY から少しく傾いている（生きている貝では如何に大きく開いても X_1 Y_1 が XY と一致することなく常に少しく傾いているものである）．尚P点は開殻している貝が漸次閉殻して行くにつれ P_1, P_2, P_3……のように順次移動して行くもので，閉殻の終り（開殻の始めと同じである）には P_3 の如き位置を占め従つて此の際の蝶番線は X_3 Y_3 のように甚だ傾いた位置を占めることになる．

ハマグリ *Meretrix meretrix* (Linné)（1949年2月有明海産）

之はアサリと全く同じ関係にある．

シオフキ *Mactra Veneriformis* (Reeve)（1949年3月有明海産）

之もアサリと同様である（Fig. 2, d）．

カガミガイ *Dosinia japonica* (Reeve)（1949年3月博多湾産）

之はアサリ，ハマグリ，シオフキ程顕著ではないが矢張蝶番軸は可変性である．Fig. 2, e に示すように閉殻筋を切つた場合の PA 線に比して生きている自然の状態の時の P_1A 線は僅かな傾きを示すのみである．

又シジミは小さいので此の測定法は行い難いが肉眼的に上と同様の関係のあることは明らかに認められる．

又異柱類のタイラギ，コケガラスのように蝶番軸が眞直であるものは測定上問題なく運動にも上のような特異性は認められない．

以上福岡市附近にて入手容易な二枚貝に就て観察した結果を示したが，開閉殻運動の際その運動の中心となる廻転軸が常に一定方向を示さないアサリ，シオフキ，ハマグリ，カガミガイ，シジミ等の二枚貝の蝶番軸を著者は**可變性蝶番軸**と名付けた（此の可変性蝶番軸を有する二枚貝に於て力学的に最も合理性を要求されるのは靱帯の開殻力が最も強力に働く開殻の始め又は閉殻の終りにあるのでその際の軸をとる可きであると考えるがその測定法は第2報に於て述べる）．

III. 可変性蝶番軸の機構

如何なる機構の下に上記のような特異な開閉殻運動を行い得るかと言うことに就ては二つの理由がある．即ち一つは靱帯の構造であり他の一つは閉殻筋の配置である．以下各例に就て検討する．

A. 靱帯の作用

Marceau[11] は "Le mouvement de bascule" を行う貝は短い靱帯を持つており，例えば *Lutraria*, *Mactra*, *Mya*, *Venus** 等に見られると述べたが，アサリ，ハマグリ，カガミガイのように相当長い靱帯を有し乍らこの運動を行い得る貝に対しては之丈の説明では不十分である．よつて著者は次に述べるように詳しく構造を研究した．

i). アサリ

靱帯は Ligament proper 外靱帯と Cartilage 内靱帯とより成り外靱帯は外部から見

えるが非弾性体である．内靱帯は見えないが非常に弾性があり閉殻される時之が圧縮されその反撥力が殻を開かしめようとするものである．今内靱帯の構造を調べようとしてもその著しい弾性の為殻に結合している自然の状態のまま取出すことが出来ないが，著者は靱帯をフォルマリンで硬化せしめることにより之を解決した．この方法で原形のまま取出し得た内靱帯及び殻に結合している靱帯の横断面を Fig. 3 に示す．C型をしたスプリングは嘴の方に(右図のCの右方)近づくにつれ小さくなつており弾力性の小さくなることが推察出来る．即ち今開いている殻が閉ぢて来て靱帯が圧縮される時は大きい方は小さい方よりも強く反撥することは当然である．従つて此の際は蝶番軸は漸次 Fig. 2, c の $X_1 Y_1$ より $X_2 Y_2$ X_3 Y_3 ……の如く移動することになる．

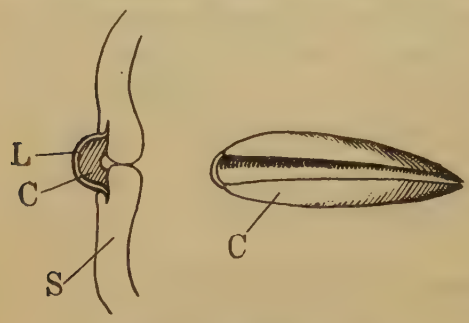


Fig. 3.
L…外靱帯．C…内靱帯．S…殻．

ii). ハマグリ

之はアサリと全く同様である．

iii). カガミガイ

前二者と構造は同じであるが唯それ等より長くて硬い内靱帯を有するので蝶番軸の可変性は余り顕著ではない．

iv). シオフキ

前三者の場合内靱帯は外靱帯と密接に結合しているがシオフキでは Fig. 4, a, b, c の各図に示したように両者は相離れて存在し殻にある小さい溝に三角柱状の内靱帯が位置している．此の三角柱状の内靱帯は横から見ると Fig. 4, のように原寸に比し閉殻時圧迫された為收縮する度合は，前部（b図のcに於て手前を指す）に於ては原寸の$\frac{1}{2}$に圧縮されるのに後部は$\frac{3}{4}$で済む．従つて前部の反撥力は閉殻する程後部のそれより大きくなる．此の事実及び内靱帯の占める方向（Fig. 4, b の AB）を考えれば殻を閉ぢる程内靱帯の方向に発揮される反撥力は強く出て来るので蝶番軸は XY に近づくことが諒解される．余り閉殻していない時は AB の方向に働く開殻力は左程強く発揮されず外靱帯の構造に支配されその方向即ち

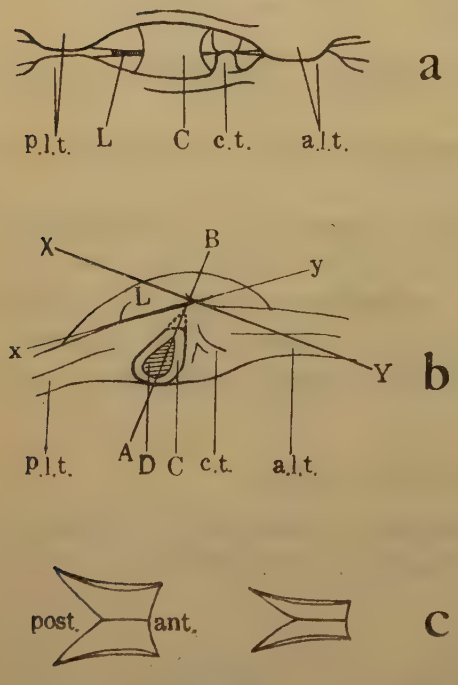


Fig. 4.
a：シオフキ靱帯部を殻の内側より見た図．
b：蝶番拡大図．　c：三角柱状の内靱帯を横から見た図．左は開殻し切つた時の形，右は圧縮された時の形．C…内靱帯．L…外靱帯．D…Cの切断面．p.l.t.…側歯．c.t.…主歯．a.l.t.…側歯．

xy に近い軸をとることになる．

B．閉殻筋の作用

殻を閉ぢる閉殻筋も靱帯と同様に可変性の軸に適応した配置をとらねばならない．一般に開閉殻運動は共通の廻転軸を持つ2枚の平板の開閉運動と考えることが出来る．然る時は Fig. 5 に於て次のような関係が成立する．

$$\frac{p}{a} = \frac{D_p}{D_a} \quad \cdots\cdots(1)$$

但しpは後閉殻筋の長さ，aは前閉殻筋の長さ，Oは蝶番軸，D_a はOより前閉殻筋に至る距離，D_p はOより後閉殻筋に至る距離．

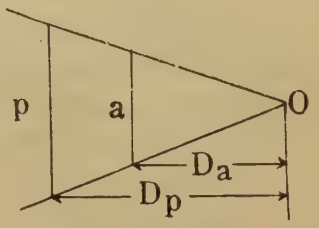


Fig. 5.

此の場合p及びaは閉殻筋の平均の長さを示すもので閉殻筋切断面に於ける重心に立てた垂線の長さと考えて良い．D_p，D_a も此の垂線迄の距離とする．此の関係は普通の二枚貝に於て成立することが Marceau[4] により認められている．然しこの関係は可変性蝶番軸を有する二枚貝には適用出来ないのであつて，此の事実は次の実験例により認めることが出来る．

第　3　表

貝　名	p/a	Dp/Da	研　究　者
Arca granosa	1.16	1.19	Marceau(1909)
Isocardia cor.	1.38	1.66	〃
Pectunculus glycimeris	1.22	1.5	〃
Pinna rudis	4.0	4.16	〃
Volsella metcalfei (Hanley)	2.52	2.92	三　宅　(1950)
Anadara subcrenata (Lischke)	1.43	1.28	〃
**Paphia philippinarum* (Adams et Reeve)	1.36	0.62	〃
**Meretrix meretrix* (Linné)	1.75	0.95	〃
**Mactra veneriformis* (Reeve)	1.46	0.85	〃
**Dosinia japonica* (Reeve)	1.20	0.87	〃

*印の貝は何れも可変性蝶番軸を有するものであつて上に示すように(1)式の関係とは一致しない．

著者は之等不一致の原因は蝶番軸の取り方が不当である為と考えた．即ち測定時軸を靱帯の方向 XY (Fig. 2, c, d, e) にとつて考えるからこのような不合理を来すのであつて，可変性蝶番軸を持つ貝では開閉殻運動の最も強力な釣合を要する時は靱帯の性質の示すように閉殻時の終り又は開殻時の始めにあることを考えれば，蝶番軸は Fig. 2, c の X_3Y_3, Fig. 2, d の X_2Y_2 に近い軸と考えるのが至当であろう．アサリ，ハマグリ，シオフキ，カガミガイ等に於て開殻時の最初に於ける軸をとり p/a 及び D_p/D_a を測定して見ると第4表のように両者の値は大体一致することが分る．

第 4 表

	アサリ	ハマグリ	シオフキ	カガミガイ
p/a	1.40	1.70	1.39	1.21
Dp/Da	1.52	1.60	1.45	1.11

即ち可変性蝶番軸を持つ貝では閉殻筋の機能から言えば Fig. 2, c に於ける $X_3 Y_3$ に近い廻転軸が最も有効な働きを持つものと考えられる．一方靱帯の機能から言つても閉殻筋を切離し靱帯のみで開閉させた場合にも開殻の最初と閉殻の終り，即ち最も力の釣合を要する時期には軸は矢張 $X_3 Y_3$ 附近にあるのであつてその後は開殻に伴い靱帯の固有の性質により順次軸が $X_2 Y_2$, $X_1 Y_1$ の如く変化して行くが，靱帯の開殻力は順次微弱化して行くので閉殻筋の閉殻力も従つて僅少で済み此の大きく開殻した場合には閉殻筋と靱帯間の力の不釣合も大して問題にならないと思われる．然し元来閉殻筋自身の持つ軸は $X_3 Y_3$ のような位置にあるもの故，最も大きく開殻した時でも閉殻筋を切つて靱帯のみの作用により開殻し切つた場合の軸 XY とは決して一致しない理由も諒解出来る (Fig. 2, c, d, e に於て閉殻筋を切つた時の PA と生きている貝の最も大きく開いた時の P_1 A を比較)．

但し此の関係は可変性蝶番軸を持つ貝には常に当て嵌るものではない．元来蝶番軸の位置を支配する要素は靱帯の構造と機能にあるのであつて，閉殻筋は寧ろ従属的な関係を持つのではないかと考えられる点がある．例えばハマグリにその例外が見られるのであるが可変的に蝶番軸の変らないハマグリがある．之の閉殻筋を切り靱帯のみで開閉殻を行わせても矢張り可変軸的な行動を取らないが，閉殻筋の方はアサリの場合の $X_3 Y_3$ 軸のように傾いた軸を持つように配置されている．之は後天的な原因による靱帯の例外的な行動と認めらる可きものと考える．

IV. 可変性蝶番軸の生態学的考察

多くの二枚貝は実際には曝露した状態ではなく砂や泥の中に半ば埋つた形で棲息し殻から水管を砂や泥の上に届くように出している．之等の水管は動物をして安全に埋没した状態に置き乍ら呼吸や食物摂取の為の新鮮な水流を得せしめるものであるが，アサリ，シオフキ，ハマグリ，カガミガイのように水管を長く出し得る種類の貝では pallial sinus が大きく且つ或るものは水管のある殻の後部が尖り水管を格納するのに都合良くなつている．之等の知られた事実の外に Marceau[11] は之等の貝では開閉殻の際後部が前部より大きく開くようになつており水管の出し入れに都合良くなつていると述べたが著者も同様のことを認めた．即ち一般にアサリ，ハマグリ，シオフキ，シジミ等では少し開殻すると前部より大きく開いている後部から先づ水管を突出して来る．次に開殻の度合が大きくなり腹部が適当に開くと今度はここから足を出すようになる．閉殻の時は之と反対のことが起る．この習性は上記の貝の開閉殻機構によく合致したもので，即ち上の実験により開殻の初期では蝶番軸は Fig. 2, C の場合 $X_3 Y_3$ 附近にあり最初に開く点は水管の出入口に近い所であるが，開殻の後期には軸は XY に近く最も開く点は腹部となり足を出すのに都合が

良いこととなる．

斯くの如く之等の貝の有する可変性蝶番軸が習性に適応した開閉殻運動を取らしめることは面白い事実である．

V. 摘　　要

1．数種の二枚貝の蝶番軸を測定しアサリ，ハマグリ，シオフキ，カガミガイ，シジミ等では之が変動性のものであることを認め之を**可變性蝶番軸**と名付けた．

2．可変性蝶番軸の機構を探り之は靱帯と閉殻筋の共同作用に基くことを明らかにした．

3．可変性蝶番軸の機能は貝の習性によく適応していることを認めた．

文　　献

1. Vaillant, L.: Ann. des Sc. nat. Zoologie, 5° série 4, 65 (1865)*.
2. Plateau, F.: Arch. de Zool. expér. et gén., 2° série 2, 144 (1884).
3. Marceau, M. F.: C. R. Acad. Sc. Paris, 141, 278 (1905).
4. Marceau, M. F.: Arch. de Zool. expér. et gén., 5m série 2, 295 (1909).
5. 田村　正：Sc. Rep. of Tohoku Imp. Univ., 4th series 4, 259 (1929).
6. Bayliss, L. E., Boyland, E. & Ritchie, A. d.: Roy. Soc. Proc. (B), 106, 363 (1930).
7. 田村　正：Sc. Rep of Tohoku Imp. Univ., 4th series 6, 347 (1931).
8. 畑井　新喜司：牡蠣の生理，62（1931）.
9. Coutance, A.: De l'énergie et de la structure musculaire chez les Mollusques acéphales. (Paris) (1878).*
10. Marceau, M. F.: Mém. Mus. Hist. nat. Belg., (2) 3, 941 (1936).
11. Marceau, M. F.: C. R. Acad. Sc. Paris, 143, 303 (1906).
12. 三宅正人：科学，20，519（1950）.
13. 大島　広：植動，11，347（1943）.
14. Anthony, R.: Bull. Soc. Ph lom. de Paris, 9° sér. 6, n° 3 (1904)*.

*Marceau[4] による．

（九州大学農学部水産化学教室）

Résumé

It is well-known that the adductor muscles of bivalves have a remarkably strong power to close the shells, and it can easily be inferred that there exist some proper mutual relations between the shells and the arrangement of the adductor muscles in opening and closing the valves so effectively.

To solve this problem from the viewpoint of dynamics, the following two ways can be suggested.

A). Research of the nature and relative position of the two components of the muscle, *i. e.* smooth muscle and striated muscle.

B). Research of the dispositions of the anterior and posterior adductor

muscles in relation to the whole system of the shell.

Up to the present no systematic explanation has been given to these points. In dealing with this subject it is first of all necessary to determine the line of hinge axis that roles as the rotation axis of the shell movement, and then to proceed to the question of the movement itself.

Having measured the hinge axis of several kinds of bivalves, the author found that these axes did not always indicate a constant line but a variable one. The author named the latter "variable hinge axis". The mechanism of this variable hinge axis is made possible by the conjugated function of the ligament and the adductor muscles.

二枚貝の開閉殻運動に関する力学的考察 (第2報)

閉殻筋の等伸度線に就て.

三　宅　正　人

Studies on the mechanism of the opening and closing movement of bivalves. 2. On the iso-elongative line of fibres of adductor muscles

Masato Miyake

九州大學農學部學藝雜誌 第十二卷 第二號 別刷
Reprinted from the Science Bulletin, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Vol. 12, No. 2, August, 1951

二枚貝の開閉殻運動に関する力学的考察（第2報）

閉殻筋の等伸度線に就て

三　宅　正　人

Studies on the mechanism of the opening and closing movement of bivalves. 2. On the iso-elongative line of fibres of adductor muscles

Masato Miyake

I. 緒　　言

第1報[1]に於て記したように非常に大きい力が働いている開閉殻運動には当然合理的な力の配置が存在せねばならないが，此の運動を力学的に見ると次の2通りの考え方があげられる．

（1） 閉殻筋夫れ自体の2構成部，即ち平滑筋部と横紋筋部の位置及び性質を力学的に解説しようとする考え方．

（2） 開閉殻運動を殻全体の系から考えて力学的観点から閉殻筋の大さ，位置又はその合力の大さ，作用点等を論ずる考え方．

(1)に就て少しく説明すると，二枚貝の閉殻筋は白い不透明な部分と透明な部分との2部から構成されているのが普通であるが，その境界線は凸面又は凹面に形成されているのが見られる．前者は平滑筋から成り後者は横紋筋から成つているが之は Bronn[2] 以来注目されたことであり Uexküll[3] がその生理に就て研究して前者を Sperrmuskel (Catch muscle) 後者を Bewegungsmuskel (Motor muscle) と名付けた所のものである．

その生理的機能に就て述べると Catch muscle を切り離し Motor muscle のみとしその作用を見ると，外套膜等に刺戟を与えている間は閉殻しているがその刺戟がなくなると直ちに開く．一方 Motor muscle を除き Catch muscle のみとしその作用を見ると殻はその位置で閉ぢたままでいる．即ち Motor muscle は瞬間性閉殻（従つてその閉殻速度は早い）を，Catch muscle は持続性の閉殻を行うものである．*

次に之等両構成部の力学的機能に就て述べると，最初此の問題に関し力学的解説を加えたのは Coutance[5] で次に Anthony[6]，その後 Marceau[7, 8] が研究している．Coutance は閉殻筋を殻から切り離すと nacré（平滑筋部）は vitreuse（横紋筋部）よりもよく縮

*之等の生理的機能は追歯車にたとえると分り易い（Grützner[4]）．即ち追歯車の逆止め爪の役目をするのが白色部で，追歯車に相当するのが透明部と考えられる．

むが，此の收縮度は殻に於ける筋の位置と関係があり nacré は收縮係数が大で殻と殻との距離が短い所に位置し，又 vitreuse は係数が小で間隔の大きい所に見出されることを述べ，Anthony は nacré は常に殻の周縁部に，vitreuse は常に内方に存在し且つ前者の総ての筋纖維は後者のそれよりも短かくなるように配置されており，* 従つて両者の境界線は閉殻筋の殻への挿入面の形によつて支配されるものであると説明した．即ち挿入殻面が凹面の時は閉殻筋の両部の境界線は Fig. 1 の bl の如く凸面となり（二枚貝の多くはそうである）．殻面が凸面の時は境界線は凹面となる（*Anomia ephippium*, *Placuna sella*, etc）．つまり此の境界線は両部が上の條件を満足するような配列をとる結果成立する線であることを述べている．所が更によく調べて見ると之等のことは多くの二枚貝には必ずしも当てはまらないのであつて，特に單柱類や異柱類ではそうでないことを Marceau[7] が見出した．即ち *Mactra glauca* では殆ど全く Anthony の言う通りであるが *Cardium norvegicum* の場合後閉殻筋では一致するが前閉殻筋では一致せず Fig. 2, a に示すように，前閉殻筋に於て平滑筋部の黒く塗つた部分の筋纖維は横紋筋部の最小の纖維よりも長い．*Tapes decussatus* では Fig. 2, b に示すように前，後閉殻筋共に平滑筋部の黒く塗つた部分は前と同じ関係にある部分で Anthony の説に従わない．*Dosinia exoleta* では此の関係は一層顯著である．*Mytilus edulis* では Fig. 2, c のように ei は両筋部の境界線であるが Anthony の言う通りであるとすれば e'i' の如くならねばならない．*Ostrea edulis* では Anthony の説によれば Fig. 2, d の如く境界線は ae とならねばならない．

Fig. 1.

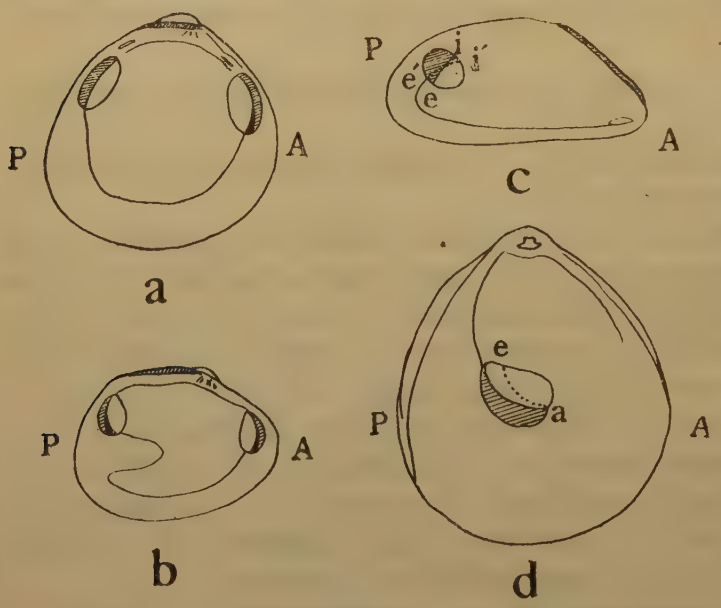


Fig. 2.
a : *Cardium norvegicum* Spengler
b : *Tapes decussatus* Linné
c : *Mytilus edulis* Linné
d : *Ostrea edulis* Linné

所で上例のような Anthony 説の矛盾に対し Marceau は

*結局此の境界線上の各筋纖維は同じ長さを示すことになる．

次のように“力の能率”を考慮に入れて之を補足説明しようとした．即ち平滑筋部は出来る丈筋繊維の長さが短かくて済むような位置を占めて伸縮の度を高めると同時に，廻転軸（靱帯）から作用点迄の距離が大になるように即ち靱帯の線から遠くなるような位置を占めることにより力の能率を大ならしめるものである．Fig. 3 のように平滑筋部の力の能率を大にする為には作用点から軸迄の距離を長くすれば良いが（即ち nn′>vv′, NN′>VV′）その結果腹部へ出張ることになり，その部分では繊維の長さが長くなり，従つて横紋筋繊維の一番短いものよりは長くなることになると説明したのである．

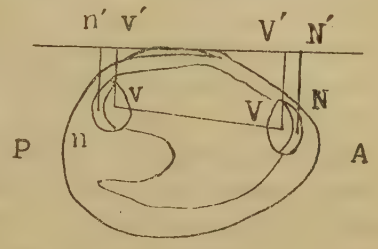


Fig. 3.

以上の説に於ては着想及び一部の事実に就ては肯定されるが尚大きな誤りのあることは見逃せない．即ち之等の説に於ては閉殻したままの静止状態に於て筋繊維の力学的配置を論じているに過ぎないが，貝は勿論静止状態にあるものではなく始終開閉殻運動を行つているものである．従つて上の説は実際の開閉殻運動を論ずるに当つては最早意味を為さないことになる．

平滑筋部及び横紋筋部は開閉殻の何れの状態若しくはその道程に於ても，力学的に矛盾のないような配列をとらねばならないと考えるのが至当と思われる．而して斯る力学的配置に於て平滑筋部と横紋筋部との境界が形づくられる可きである．

つまり今迄平面的に解説しようとした所に無理があつたのであるが，著者は立体的に考え筋繊維の伸縮率を導入することにより，開閉殻した場合閉殻筋の平滑筋部と横紋筋部との境界線上にある各筋繊維は同じ伸縮率を持つこと* を見出したのであるが，多くの実験により平滑筋部は開閉殻運動の際は必ず横紋筋繊維の何れよりも大きい伸縮率を持つような位置を占めて機能上から見て矛盾のない配列状態にあることが判然としたのである．

（上記の諸氏の説のように仮に此の境界線が同じ長さの筋繊維より成ることを原則的に認めるならば，開殻した時にはその線上にある筋繊維の伸度は夫々異なり機械的に性質の異なる筋繊維が配列していることになるが，このような矛盾，或は之に対する Marceau のような苦しい説明は全く解消されることになる．）

今二枚の板が一つの蝶番軸を中心として開閉するとすれば Fig. 4, a に於て次のような関係が成立する．

AO 及び A′O は O を中心として開閉する 2 枚の板，

AO 及び A′O が aO 及び a′O に開いたとすれば

$$\frac{ab}{AB}=\frac{cd}{CD} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

即ち(1)式により 2 枚の板が如何ように開閉しようとも両板の間に挟まれた 2 間隔の AB 及び CD の伸縮の度合は上の関係により等しい．従つて此の関係を満足する板の間に存在して開閉を司る筋肉は同じ性質のものでよい筈である（逆に言えば同じ性質の筋肉は同

*従つて此の境界線上の各筋繊維は同じ機械的性質を持つ．

じ機械的変化を受ける点に配列するものであるとも言える). 此の関係が表題の等伸度線に関する研究の根本をなすものである.

今(1)の問題に就て著者の研究により確められた事実を要約すれば次の如く言い得る.

即ち平滑筋部の繊維は殻と殻との間の距離が短かい位置即ち殻の周辺部にあつて殻が開閉する際それ等筋繊維の受ける伸縮率が大きくなるようになつて居る——平滑筋部は閉殻を強力に維持しようとする性質から言つて斯くの如き配置をとれば, 少しの開殻に対してもその張力は鋭敏に影響され靱帯の力に拮抗することが出来る——又横紋筋部の筋繊維は殻と殻との間の距離が遠い位置即ち殻の内方にあつて殻の開閉の際筋繊維の受ける伸縮率は平滑筋よりは小さくて済むようになつて居る. 逆に言えば筋の僅かな収縮によつて殻は大きく閉ぢ, 速かに閉殻しようとするその性質に適しており, 且つ開閉殻した場合両筋繊維の斯る力学的機能が相互に整然と守られるような配置をとり, その結果としてその境界線が形成されているものであることを明らかにした.

II. 実　驗　之　部

A. 蝶番軸の測定法

殻の開閉運動に関し力学的考察を行うには先づ二枚の殻の開閉運動の中心となる蝶番軸の位置及び方向を知らねばならない. アカガイ, コケガラスの如く蝶番が一直線をなし且つ固定しているものは測定するまでもないがアサリ, シオフキ等の如く可変性蝶番軸を持つ貝ではその軸を如何にとればよいかが問題である. 著者は次の如く測定を行つた.

既に第1報に於て述べた如く可変性蝶番軸を持つ貝では開閉殻の際最も力学的に釣合を要するのは靱帯の開殻力の最も強力に働く開殻の始め又は閉殻の終りであることを考えれ

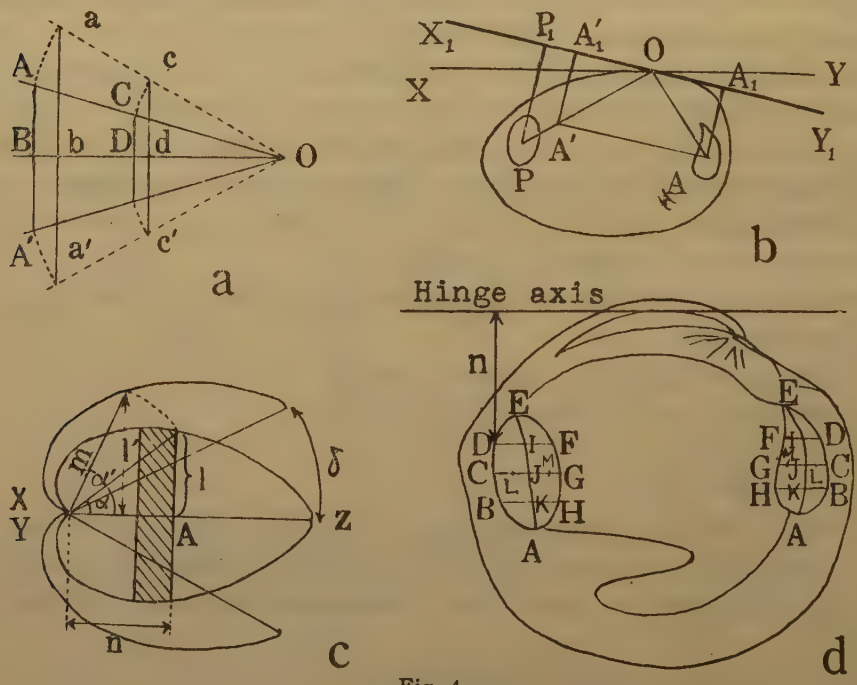


Fig. 4.

ば，之等の貝では重要な蝶番軸はその際とられる軸であることが考えられる．

今 Fig. 4, b に於てO点を可変性軸の何れもが通る靱帯上の一点とする．A, P は前後閉殻筋の中心，XY は見掛けの蝶番軸，X_1 Y_1 は求める蝶番軸．Aより X_1 Y_1 に平行線を引き OP との交点を A′ とし之より X_1Y_1 に垂線を立て X_1 Y_1 との交点を A_1' とする，又Aより X_1 Y_1 に垂線を立て A_1 を得る．

然る時は第1報(1)式により

$$\text{柱の長さの比 } \frac{p}{a}=\frac{PP_1}{AA_1}=\frac{PP_1}{A'A_1'}=\frac{OP}{OA'}$$

故に閉殻筋の長さの比 p/a を求め OP 上に上式の成立するような A′ 点を求め AA′ に平行でO点を通る線を引けば求める蝶番軸を得る．

B．閉殻筋の伸(縮)度測定法

Fig. 4, c に於て仮に A 点に於ける閉殻筋繊維の伸 (縮) 度に就て論ずるとする．閉殻状態からある角度 2δ 開殻した場合の筋繊維の伸度は如何になるかと云うと，

l……閉殻時のA点に於ける筋繊維の長さの$\frac{1}{2}$，XY……蝶番軸．α……殻に於ける筋繊維着点と XY 軸とを結ぶ線が XZ 面となす角度，α'……$\alpha+\delta$（δは開殻した角度の$\frac{1}{2}$），m……筋繊維の殻に対する着点より蝶番軸迄の距離，n……A点より蝶番軸迄の距離，l′…… 2δ 開殻した場合の筋繊維の長さの$\frac{1}{2}$．然る時は伸度は次の如くして求められる．

$l'=m\sin\alpha'$　但し $m=n\sec\alpha$

又αは $\frac{l}{n}=\tan\alpha$ より求められる．

従つて筋繊維の伸度 l'/l を求めるには l 及び n を測定し任意の角度を与えれば上の如く l′ が計算されるから原長 l に対する比が求められる．

l 即ち筋繊維の長さの測定法としては Marceau[7] は貝にフォルモールの稀水溶液を加え固定し次に酸で殻を溶かし離脱せしめた閉殻筋の筋繊維の長さをコンパスで測定しているが，之は不正確であるので著者は次のようにして測定した．即ち左右殻の相称である貝をとりその何れかの殻の縁に跨つて平板を差渡し，そこから閉殻筋の痕に印した測定点迄の距離をミクロスケールで測定する．但し殻の縁は凹凸のある平面を形成しないことを要するわけである．

又測定点及び m の測定は次のように行つた．即ち Fig. 4, d に見るように蝶番軸にほぼ平行な線で閉殻筋を4分し且つ此の各々の線の中央を通つて縦に線を引き定めたもので，L, M は夫々C, J 及び J, G の中点である．尤も之等の点のとり方は厳密なるを要しない．又 n の測定法としては原寸写生器[9] で殻，蝶番軸及び閉殻筋痕の上記諸点を写生すれば此の図上に於て計測される(Fig. 5 及び 9 を参照)．

之等の測定法はアサリ，ハマグリ等左右殻の相称である貝は殻巾が同一であることを確め何れか一方の殻に就て行えば良いのであるが，カキのように非相称であるものには適用出来ないので著者は閉殻筋の位置に粘土或は石膏のような可塑剤を充塡し閉殻筋の型をとり，此の閉殻筋の模型に印された閉殻筋痕の一方の印 A, B……の諸点及び他の面上の A′, B′……諸点間の距離をキャリパスで測定して求めた．次に少しく開殻せしめた位置に於て

同様のことを行い開殻した場合の筋繊維の長さを求めた.

又開殻角度に就ては之が大きくなると蝶番軸の可変性である貝では軸の位置が移動しnの値が変り従つて計算値も変つて来るので（但し変化は少い）成可く小さい角度を選ぶべきである.

C. 実 驗 結 果

i) イタボガキ *Ostrea denselamellosa* Lischke（1949年3月博多湾産）

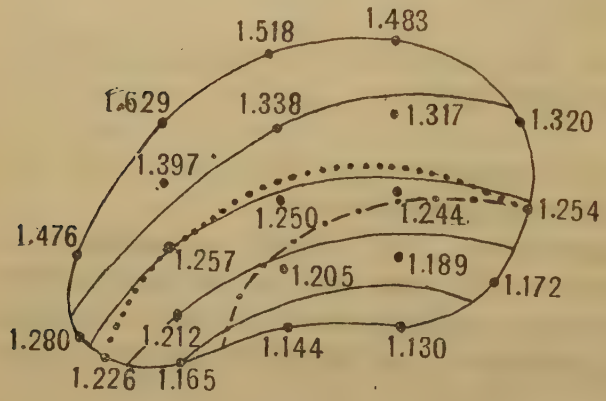


Fig. 6.

イタボガキ閉殻筋に於ける等伸度線分布図. 点線は平滑筋部と横紋筋部との境界線，破線は Marceau 等の説による線.

Fig. 5, a に示した原図の閉殻筋に於て A, B …… U 諸点の筋繊維伸度測定結果を Fig. 6 に示す. 即ち上記の方法によりカキの貝殻を或る角度開殻せしめた場合の筋繊維の伸度を計算し，之等の伸度の内等しい値を持つ点を結んだ等伸度線分布図を作製して見ると等伸度線の或る1本の線は平滑筋部と横紋筋部との境界線に大体一致することが分る. 又破線は Anthony[9], Marceau[7] 等の説による境界線（A点に於ける筋繊維の長さと同じ長さを持つ点を連ねた線である）を示したのであるが，図に示す如く実際の境界線とは甚しく背馳していることが認められる.

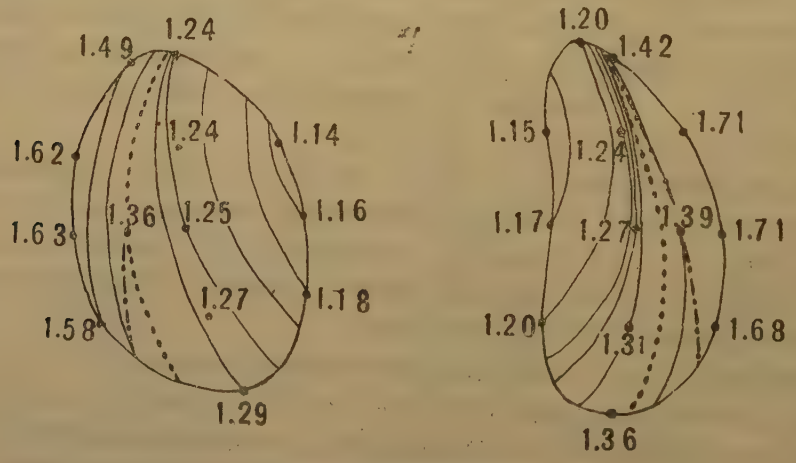


Fig. 7.

カガミガイ閉殻筋に於ける等伸度線分布図.

ii) カガミガイ *Dosinia japonica* (Reeve)* (1949年3月博多湾産)

結果は Fig. 5, b 及び Fig. 7 に示す如く境界線 b 1 は等伸度線の或るものと一致することが認められる．又 Marceau 等の線† (破線) は一致しないことを示している．

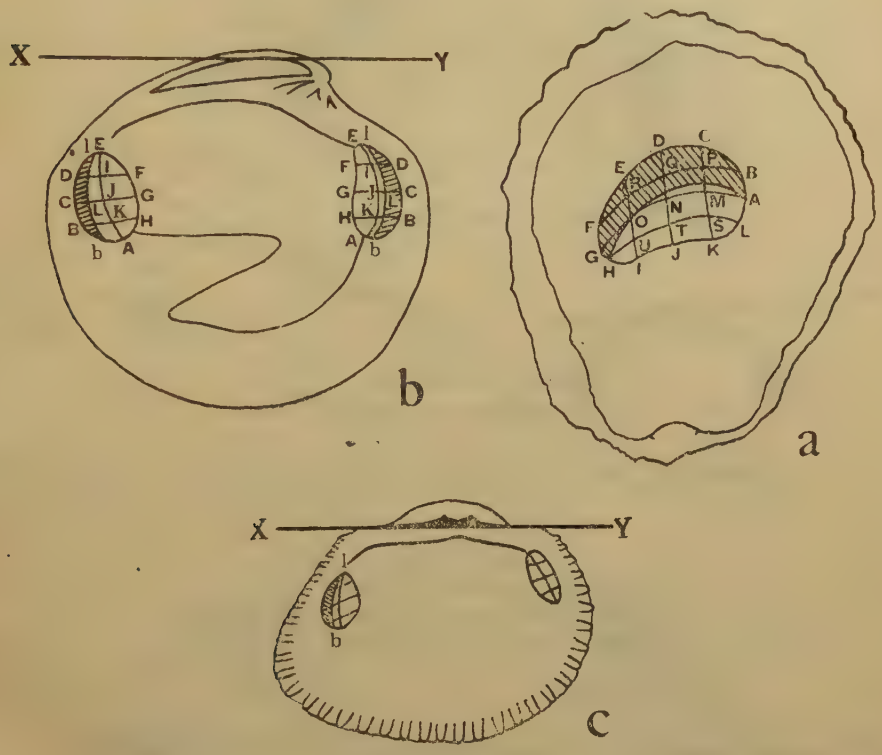


Fig. 5. (×4/5)

a : *Ostrea denselamellosa* (Lischke)

b : *Dosinia japonica* (Reeve)

c : *Anadara subcrenata* (Lischke)

閉殻筋に於ける斜線の部分は平滑筋部，　b，1は平滑筋部と横紋筋部との境界線．　A，B…の諸点は伸度の測定点．

iii) サルボウ

結果は Fig. 5, c 及び Fig. 8 に示す如くであるが上2例と同様のことが言える．尚サルボウでは前閉殻筋に於ける境界線 b1 が判然としないので記入してない．

iv) ハマグリ *Meretrix meretrix* (Linné) (1949年1月有明海産)

結果は Fig. 9, a 及び Fig. 10 に示す．

*以下の実験例では殻が 3° 開いた場合の結果を示す．

†以下の図ではE点側に於ける境界線端の筋繊維の長さと同じ長さを持つ点を連ねた線である．

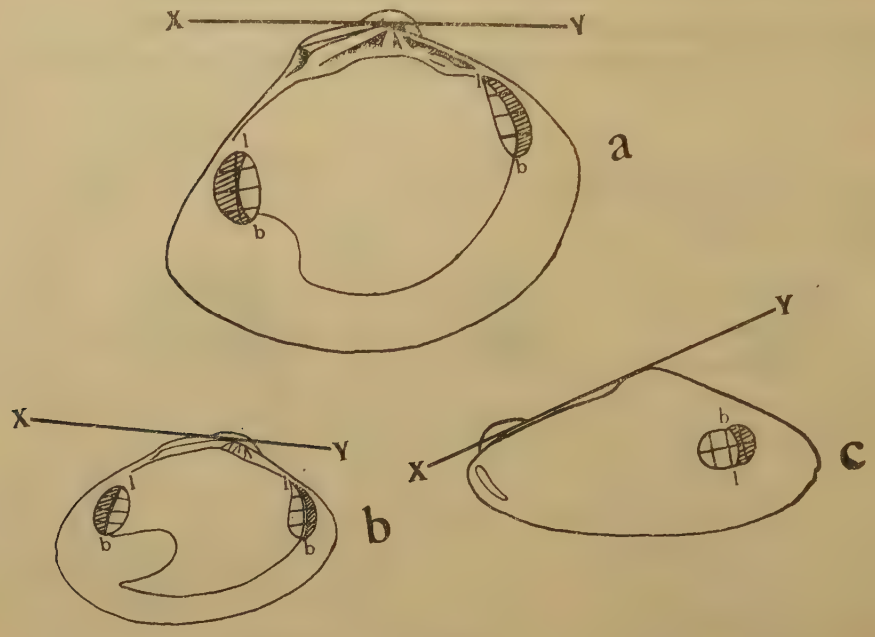


Fig. 9. ($\times\frac{1}{5}$)
a : *Meretrix meretrix* (Linné)
b : *Paphia philippinarum* (Adams et Reeve)
c : *Volsella metcalfei* (Hanley)

(N) サルボウ *Anadara subcrenata* (Lischke) (1949年3月有明海産)

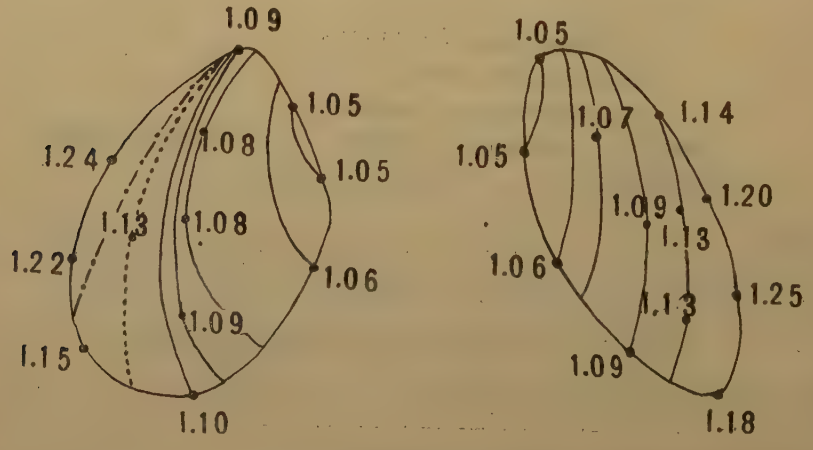


Fig. 8.
サルボウ閉殻筋に於ける等伸度線分布図.

v) アサリ *Paphia philippinarum* (Adams et Reeve) (1949年3月有明海産)
結果は Fig. 9, b 及び Fig. 11 に示す.

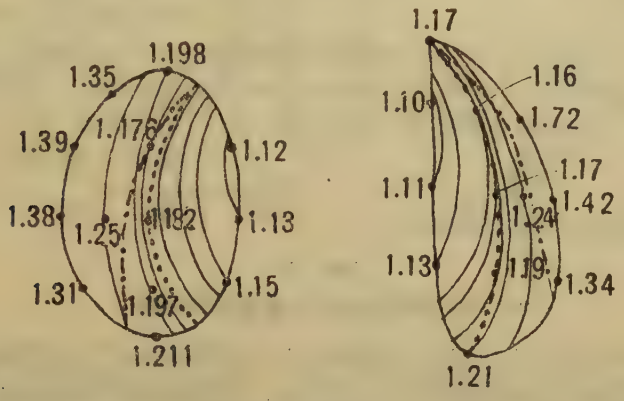


Fig. 10.
ハマグリ閉殻筋に於ける等伸度線分布図.

vi) コケガラス *Vollsella metcalfei* (Hanley) (1949年3月有明海産)
結果は Fig. 9, c 及び Fig. 12 に示す.

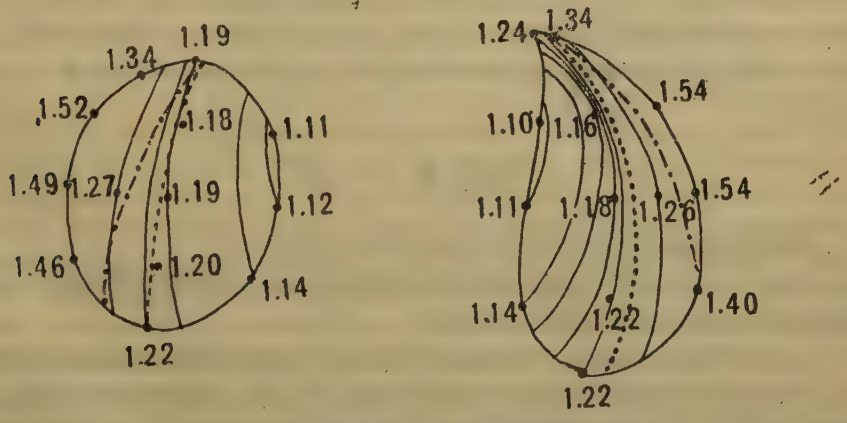


Fig. 11.
アサリ閉殻筋に於ける等伸度線分布図.

D. 考　察

以上の各実験例に於て貝が或る角度開殻した場合閉殻筋の諸点に於ける筋繊維の伸度を測定した結果次のことが明らかとなつた. 即ち等しい伸度を持つ点を結んだ等伸度線分布図を作製して見ると閉殻筋を構成する筋繊維は各図例に示したような一定の配列状態にあり，平滑筋部は開閉殻に当り横紋筋部よりも伸縮率の大なくなるような点に位置を占めて之等筋繊維の受ける伸縮率が大きくなるようになつており，平滑筋の強力に閉殻を維持し

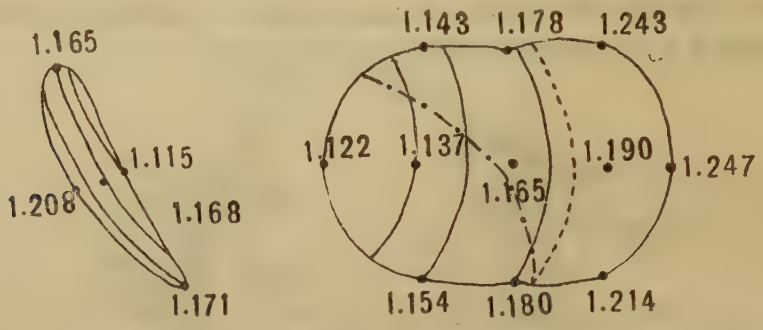


Fig. 12.

コケガラス閉殻筋に於ける等伸度線分布図*.

ようとする性質から言つてこのような配置は少しの開殻に対してもその張力が鋭敏に影響され靱帯の力に対抗するのに都合良くなつている．又横紋筋部の筋繊維は之と逆の関係にあり伸縮率の小さい点に位置を占め筋の僅かな収縮によつて殻が大きく閉ぢるのに都合よく配置されているのである．しかも開閉殻した場合両筋繊維の斯る力学的機能が相互に整然と守られるような配置をとり，又その結果としてその境界線が形成されているものであることは，閉殻筋の両構成部即ち Catch muscle と Motor muscle との境界線が此の等伸度線の内の或る1本の線と一致することから自ら諒解される所である．

尚各実験例に於て Anthony 及び原則的には彼の説を認めている Marceau 等の解釈によつて求めた境界線を夫々破線で示したが，実際の境界線からの背馳は相当甚しく閉殻状態のみで論じた問題の取扱い方の根本的な誤りと相俟つて全く妥当性を欠くことが認められる．

III. 摘　　要

1．可変性蝶番軸を持つ貝の場合の同軸の求め方を記した．

2．任意の角度に開殻した場合の閉殻筋各筋繊維の伸度を求め等伸度の点を連ねた等伸度線分布図を数種の二枚貝に就て作製した．

3．此の等伸度線分布図により閉殻筋の平滑筋部と横紋筋部の力学的機能が整然と配列され，しかも相互に混同することなく区別されるように等しい伸度を持つ境界線により区分配列されていることを明らかになし得て，従来の力学的説明に比し矛盾なく閉殻筋の力学的配列を解明することが出来た．

文　　献

1．三宅正人：九州大学農学部学芸雑誌，第12巻，第2号，第1報（1951）．

2．Bronn, H. G.: Klassen und Ordnungen der Weichthiere, Bd. III, 360 (1862).

*此の例の破線はG点側に於ける境界線端の筋繊維と同じ長さを持つ点を連ねたものである．

3. Uexküll, J. V.: Zeitschr. f. Biol., 58, 305 (1912).
4. Grützner, P.: Ergeb. Physiol., 3 (2), 12 (1904).
5. Coutance, A.: De l'énergie et de la structure musculaire chez les Mollusques acéphales. (Paris) (1878)*.
6. Anthony, R.: Bull. Soc. Philom. de Paris, 9° série 6, n° 3 (1904)*.
7. Marceau, M. F.: Arch. de Zool. expér. et gén., 5m série 2, 295 (1909).
8. Marceau, M. F.: Mém. Mus. Hist. nat., Belg., (2) 3, 941 (1936).
9. 三宅正人：科学, 20, 519 (1950).

*Marceau[7] による.

（九州大学農学部水産化学教室）

Résumé

This report describes the results of the experiments made for research (A) mentioned in Report 1. Considering the static ways of explanation adopted by Anthony and Marceau unsatisfactory, the author gave these matters dynamic methods of research, by which the opening and closing movement of the adductor muscles would be explained consistently and adequately.

The author measured the elongation of the fibres of adductor muscles when the shell was opened to a certain angle, and drew up the diagram of isoelongative line, and found that the fibres of adductor muscles were oriented in a regular system. As the smooth muscle was placed nearer the edge of the shell, the elongation of its fibres was larger than that of the striated muscle. Thus the smooth muscle, with its function of strongly closing the shells, was enabled to oppose effectively the opening power of the ligament by its high susceptibility to the opening tension of the shell. The fibres of the striated muscle, being placed nearer the center of the shell, had smaller elongation and could quickly close the shell by contracting itself comparatively little.

Moreover, from the fact that the border line between the two components of the adductor muscle corresponded to one of the isoelongative lines, it could be clearly recognized that, when opening and closing, the fibres of these component muscles strictly conformed to their function, and, as a result, the border line was properly drawn between them.

The author also pointed out both the incorrectness of the border line drawn up by Anthony and Marceau who approved in principle Anthony's theory, and the fundamental lack of validity in their attitude towards, and treatment of the subject, which was restricted to the condition of the shell only when it was closed.

二枚貝の開閉殻運動に関する力学的考察（第3報）

イタボガキ閉殻筋の位置に就て

三　宅　正　人

Studies on the mechanism of the opening and closing movement of bivalves. 3. On the position of the adductor muscle of *Ostrea denselamellosa* Lischke

Masato Miyake

九州大学農学部学芸雑誌，第12巻，第3号，別刷
REPRINTED FROM THE SCIENCE BULLETIN OF THE FACULTY OF AGRICULTURE, KYUSHU UNIVERSITY,
VOL. 12, NO. 3, MARCH, 1952

二枚貝の開閉殻運動に関する力学的考察（第3報）

イタボガキ閉殻筋の位置に就て

三　宅　正　人

Studies on the mechanism of the opening and closing movement of bivalves. 3. On the position of the adductor muscle of *Ostrea denselamellosa* Lischke

Masato Miyake

I. 緒　　言

開閉殻運動を力学的に見る時二通りの考え方のあることは第2報[1]に於て述べた如くであるが，本報以下に於ては残る（2）の問題に就て研究した結果を報告する．

先づ單柱類の閉殻筋に就て考えると，開閉殻運動を合理的に行う為には閉殻筋は出来る丈靱帯に対して垂直方向にあり，又殻の中央に近く且つ靱帯から成る可く遠い位置にあることが望ましい．

然し此のような目的を以て閉殻筋の位置に就て論じた報告は未だ見当らず，唯 Downing[2] が *Anadonta grandis* Say を用いその前後両閉殻筋の位置を生物測定学上の目的を以て測定しているのみである．

著者はイタボガキに就て実際どの程度此の力学的合理性を満足しているかを調査したのであるが，靱帯及び閉殻筋は共に合理的に作用し得るように夫々配置されていることを認めたので以下之に就て報告する．

II. 実　験　之　部

閉殻筋の位置を論ずる場合何を基準にしてその位置を定めるかゞ問題となるが，著者はイタボガキでは殻の重心が殻の中に於て一定の位置を占めていることを実験により確めたので之を閉殻筋の位置の認定の為の基準とした．又之等の測定には岩等に附着の為変形している左殻を避け遊離している右殻を用いた．尚カキは 1949年 1月博多湾産の 55～80.5 mm 殻長のもの 100ケを用いて測定を行つた．

A．殻重心の位置

殻の重心は殻内面の任意の一点を鉛筆の尖端上に当て殻を上にして支え，水平に支え得る点を見出すことにより求め，印を附した後殻及び殻の重心を原寸写生器[3]で写し取り此の図上に於て測定を行つた．

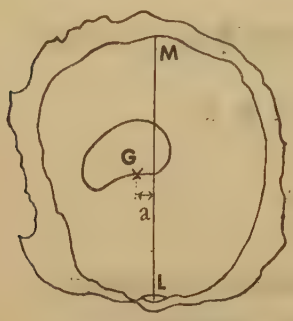


Fig. 1.

殻の重心G：

実驗結果

i）殻重心の位置は略々靱帶の垂直二等分線上にある（Fig. 1, ML).

即ち測定の結果試料100ヶ中

a）靱帶の垂直二等分線上にあるもの……26ヶ.

〔此の線からの偏差（Fig. 1のa）が靱帶から殻内面の緣に至る迄の距離（Fig. 1の ML）に対し1%以内のもの〕.

b）此の線の左側に存在するもの（偏差は1～5%のもの）……22ヶ.

c）右側に存在するもの（偏差は1～5%のもの）…22ヶ.

d）左側にあつて偏差5%以上のもの……17ヶ.

e）右側にあつて偏差5%以上のもの……13ヶ.

ii）殻の重心は靱帶の垂直二等分線上に於て靱帶から殻周辺迄の距離の 0.46倍 の点に位置する.

即ち試料100ヶの内

a） 0.40倍 以下の点に位置するもの……6ヶ.

b） 0.40～0.50 倍 以下の点に位置するもの……88ヶ

c） 0.50倍 以上の点に位置するもの……6ヶ.

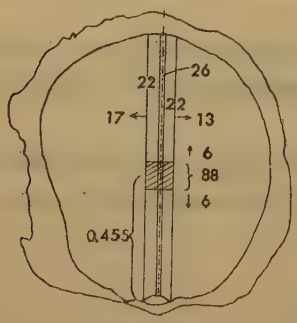


Fig. 2.

而して平均値は 0.455であつた.

上の（i）及び（ii）の結果から殻の重心は Fig. 2 に示される斜線の部分に位置することが明らかとなつた.

此の結果より考えると殻は靱帶の垂直二等分線から見て左右均等に発育して行くものであることが分る. 又換言すれば靱帶は殻に対して常に力学的にも都合良く作用し得る位置にある.

然らば閉殻筋は殻の如何なる位置にあるかと言うことに就ては次に述べる.

B. 閉殻筋の位置に就て

閉殻筋の位置は殻の重心及び閉殻筋痕をインキで印した後殻を原寸写生器で写生したものに就て図上で測定した.

実驗結果

i）閉殻筋の下緣は殻の重心に接している（Fig. 3）.

即ち

a）殻の重心が閉殻筋の内部に位置するもの……23ヶ

b）閉殻筋の下緣に接して位置するもの……32ヶ

c）閉殻筋に極く接近してその下側に位置するもの……45ケ

ii）閉殻筋の中心は靱帯の中央から殻の重心を通り殻の周辺に至る線（Fig. 3 の LGM）上より，その線の長さの 5.76/100 の長さ（図中の a）丈左にズレた点に存在する．

そのズレの分布状態は Fig. 4 に示す如くであつてその平均値が 5.76/100 である．

但し閉殻筋の中心は閉殻筋のみを原寸写生器で写し取り之の切抜きに就て，任意の2点よりの重力の方向に向う垂線の交点を求める方法により測定した．

上の（i），（ii）の結果により閉殻筋は Fig. 3 に示すように殻重心の上に乗り且つ靱帯と殻重心とを結ぶ線より左に少し寄つた点に位置することが分る．

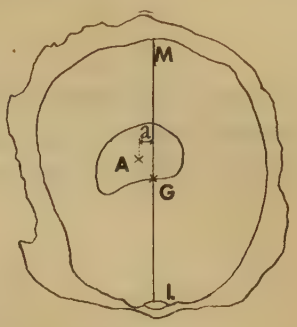


Fig. 3.
G：殻の重心．A：閉殻筋の中心．

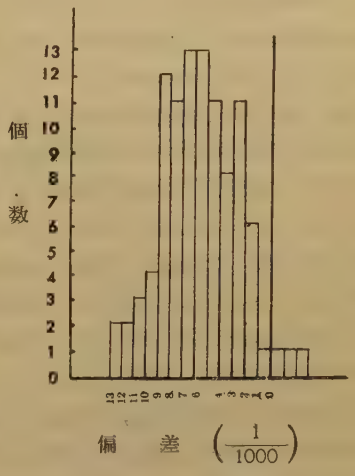


Fig. 4.

III. 考　　察

（A），（B）に示す結果により次のことが言える．即ち力学上から言つて靱帯の開殻作用が殻の中心（重心）に向つて働いているのは合理的である．又閉殻筋の中心は靱帯と殻の重心とを結ぶ線〔（A）の実験結果により靱帯の垂直二等分線と同じことになる〕上にあれば條件を満足出来るのであるが，実験結果によればイタボガキでは閉殻筋の中心は此の線上から多少ズレては居るが開閉殻運動をするのに大体に於て合理的な位置を占めていると言い得る．

IV. 摘　　要

1．イタボガキの殻の重心の位置は大体一定している．

2．靱帯の開殻作用は殻の中心（重心）に向つて働いている．

3．閉殻筋は殻重心の上に接し且つ靱帯と重心とを結ぶ線上より少しく左方（殻に対して後方）に寄つた点に位置する．

4．閉殻筋の閉殻作用も大体殻の中心に働いている．

文 献

1) 三宅正人：九州大学農学部学芸雑誌, **12**, 165 (1951).
2) Downing, E. R. : Amer. nat., **36**, 395 (1902).
3) 三宅正人：科学, **20**, 519 (1950).

(九州大学農学部水産化学教室)

Résumé

This report describes the results of the experiments made for research (B) mentioned in Report 1.

In monomyaria, it is desirable from the viewpoint of dynamics that the adductor muscle is situated on the perpendicular bisector line of ligament far apart from the ligament.

The author investigated on *Ostrea denselamellosa* Lischke whether the rational relation above mentioned was actually recognizable, and found the fact that the mechanical actions of adductor and ligament are equally effectual in closing and opening the valves. (For the determination of the position of adductor, the center of the gravity of the shell was chosen as a standpoint because it was settled on a definite part of the shell.)

1. The center of the gravity of the shell is situated on or near the perpendicular bisector of the ligament.

2. Roughly speaking, it may be said that the center of the gravity of the shell is situated about half the way from the ligament to the inner margin.

3. The lower margin of the adductor muscle is tangent to, or near, the center of gravity.

4. The center of the muscle is situated on the left side and apart 5.76/100 distant from the line which passes the center of gravity on the way from the center of the ligament to the inner margin.

二枚貝の開閉殻運動に関する力学的考察 （第4報）

閉殻筋合力の作用点に就て

三　宅　正　人

Studies on the mechanism of the opening and closing movement of bivalves. 4. On the position on which the resultant of adductor muscles acts

Masato Miyake

九州大学農学部学芸雑誌，第12巻，第3号，別刷
REPRINTED FROM THE SCIENCE BULLETIN OF THE FACULTY OF AGRICULTURE, KYUSHU UNIVERSITY,
VOL. 12, NO. 3, MARCH, 1952

二枚貝の開閉殻運動に関する力学的考察（第4報）

閉殻筋合力の作用点に就て

三　宅　正　人

Studies on the mechanism of the opening and closing movement of bivalves. 4. On the position on which the resultant of adductor muscles acts

Masato Miyake

I. 緒　　言

二枚貝に於ける開閉殻運動は2枚の平板の開閉運動にたとえられることは第1報[1]に於て說明したが，更に双柱類では次の如き関係が認められる．

即ち Fig. 1 に於てXYは蝶番軸，Pは後閉殻筋の力の中心点（p）に働く閉殻力，Aは前閉殻筋の力の中心点（a）に働く閉殻力，D_p，D_aは（p）点，（a）点に立つ垂線とXY軸との距離とすれば，閉殻力は PD_p+AD_a で表わされる．

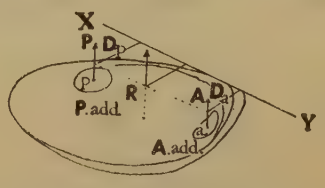


Fig. 1.

而して靱帯の開殻せんとする力の能率をFとすれば，$F>PD_p+AD_a$ の時は開殻し，$F<PD_p+AD_a$ の時は閉殻する．

此の PD_p+AD_a は合力として，（p）及び（a）に立つ垂線を結ぶ線上に於て夫々の閉殻筋の力の大さの反比に内分する点Rに働くものと考えることが出来る．

（但し此の場合閉殻筋の力の中心を如何にとるか，又力の大さを如何にして計測するかゞ問題となるが，実際問題として狭い閉殻筋の中で力の中心点の取り方が少し位間違つても此の実験には余り影響がないので閉殻筋断面の重心を力の中心と考え，又力の大さは断面積に比例するものとして実験を進めた．）

扨て上の合力の働く点即ちRは如何なる点に位置するかと云うに，靱帯が固定している貝ではどこに合力が働いても，開閉殻に際し殻の前後に於ける開きに不同を生ぜず問題はないが，可変性蝶番軸を持つ貝では合力点の位置如何によつては甚しく傾斜した開殻状態を呈し，貝の常時に於ける開閉殻運動と著しく相違し不都合となる．此の場合閉殻筋の合力は靱帯の作用と全く一致した行動をとることが出来る位置に働いているべきである．

著者は実験により此の事実を確め得たので以下之に就て記する．

II. 実驗之部

実驗は靱帯の開殻運動及び閉殻筋合力の位置に就て別々に調査した後，両者の作用を照合し一致するや否やを調査する方法によつた.

i）靱帯の開殻動作.

a）靱帯の開殻運動記錄

靱帯のみの作用で（之は閉殻筋を切断しその作用をなくしたもの）開殻せしめその運動をキモグラフで記錄するのであるが，此の場合靱帯から等距離* にある殻上の前端と後端の任意の2点で開殻の狀態を記錄すると Fig. 2 の如くなる.

Fig. 2.

Aは殻前端，Pは後端に於て記錄した開殻の狀態を示すものであるが，P側の振巾（特に開殻初期に於ける）が大きい．之は可変性蝶番軸を持つ二枚貝の場合起る現象である．但しA，Pとも開殻曲線は一度最大の振巾に達した後少しく閉殻の狀態を示して居るが，之は靱帯のみの開殻作用はその速度が早い為キモグラフを相当の速度で廻転し乍ら閉殻から開殻し切る迄の狀態を記錄するのであつて，靱帯の彈性の為実際の最大開殻点を通り越して然る後その反動として又逆戻りして少しく閉殻しその後開殻の平衡点に達することを示すものである．従つて実際の開殻の最高点は図に示された頂点より少しく前にあるものと考えられる.

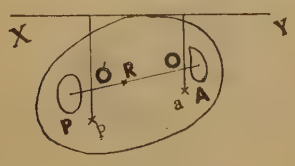


Fig. 3.

b）上の記錄を基とした閉殻筋合力点の位置の調査.

Fig. 3 に示す如き殻前端の任意の1点aを針の尖端で抑え乍ら開殻を行わせ，又殻後端のp点に於て同様のことを行えば，靱帯の動作に釣合う閉殻筋合力点の位置を探索することが出来る．即ち前者の場合閉殻筋の合力がaからXYへの垂線と両閉殻筋を結ぶ線PAとの交点Oに働くものと仮定して開殻させることになるが，此の時P側の運動をキモグラフに記錄した前の図のP線上を辿り乍ら開殻させると，A側の開殻運動は靱帯のみで開殻した時記錄したA線上を通らないで少しく上にズレる．即ち此の場合P側に於ける開殻の大さを靱帯のみで開殻した時のP側に於ける開殻の大さと同じにとり乍ら行つたのであるが，此の作用点に閉殻筋合力が働いて開殻するものとすれば，靱帯による開殻時に比し，A側が少しゝか開殻しないことになる．次に同様のことをP側の点pに於て実施すると今度はA側の運動は下にズレる．即ち此の場合O′点に合力が働いて開殻することになるが，靱帯による開殻時に比しA側が開き過ぎるのであつて此の両実驗により閉殻筋の合力はO点とO′点の中間附近に働いていることが想像される.

---

* 此の場合見掛の蝶番軸をとつたことになるから殻の前後に於ける殻間の開きは可変性蝶番軸を有する二枚貝の場合は異なる訳である.

之等の実験結果は Fig. 4, a′, b′, c′ に示す通りである.

ii) 計算による閉殻筋合力点の位置.

閉殻筋合力点の位置は又計算によつて求められる. 即ち閉殻力は閉殻筋の断面積の大さに比例するものとすれば, Fig. 3 に於て合力点Rは両閉殻筋の中心を結ぶ線をP, Aの断面積の大さの反比に内分した点に位置する.

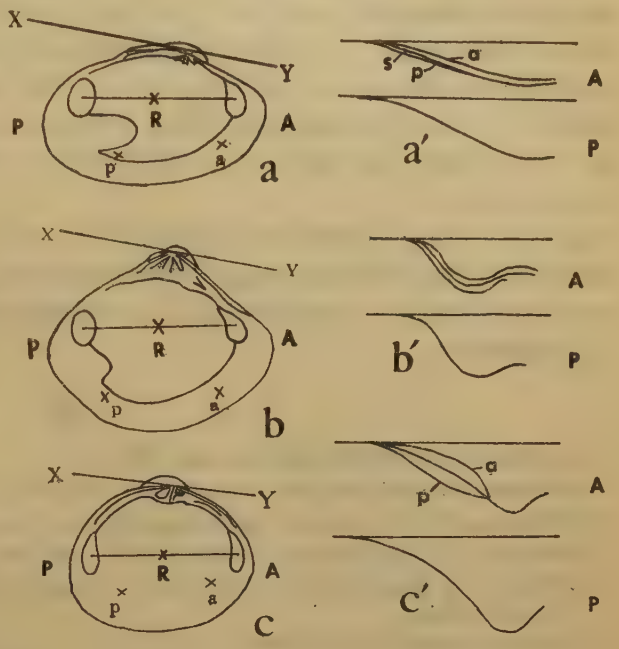


Fig. 4. c, c′：シオフキ. a, a′：アサリ. b, b′：ハマグリ.

断面積の測定は開殻力及び閉殻力を測定する際その大さを知ることが必要な為諸研究者により色々な方法で行われた. 即ち Plateau[2] は閉殻筋の断面を楕円形と考え長, 短2ケの直径を測り面積を算出した. Marceau[3] は閉殻筋の痕をインクで印をつけ, 之を殻の両端に渡した硝子板に投影した写生図から計算し, Bayliss 等[4] は閉殻筋の長さと重さから求めた. 但し密度を均一とし又全繊維が張力の方向に平行であると仮定した. 又田村[5] は閉殻筋の痕を墨で塗り此の上にトレーシングペーパーを当てゝ直接写し取り, 或は透視して写し之をプラニメーターで測定した. 然し之等の方法は何れも甚しく不正確なので著者は新に考案した原寸写生器[6] により閉殻筋痕を写しとり之をプラニメーターで計算した.

第　1　表

貝の種類		閉殻筋断面積 cm^2	閉殻筋間の距離 cm	合力点の位置 (R)（A側よりの距離 cm）
アサリ	P	0.288	3.08	1.71
	A	0.231		
ハマグリ	P	0.470	4.10	2.32
	A	0.362		
シオフキ	P	0.167	3.00	1.58
	A	0.150		

III. 考 察

Fig. 4, a のアサリではa，p両点の位置の取り方が少しく殻の前方に寄り過ぎた為 Fig. 4, a′ に見る様にp線はS線（本来の線）に殆んど一致しているが，之は結局S線はp線の画かれる場合作用した力と同じような点に合力が働いて出来た線であることを意味している．即ち Fig. 4, a に見るように両閉殻筋を結ぶ線とpからXYへの垂線との交点はRに近い事が認められる．尚アサリ，ハマグリの如く靱帯が長く且つ割合に固いものと異なり，シオフキの如く靱帯が短く球状をなすものは少しでも合力点の位置がズレると激しく傾いて開殻する為 Fig. 4, c′ の A側に於けるa，p両線は大きな開きを持つていることが示される．

以上（i），（ii）の実験結果を比較対照することによりアサリ，ハマグリ，シオフキ等では靱帯の正規の開殻作用に釣合うべき閉殻筋合力点と，計算により求めた閉殻筋合力点Rとは大体一致している事が示される．従つて靱帯と閉殻筋の作用はよく一致していることが諒解出来る．

文 献

1) 三宅正人：九大農学部学芸雑誌 **12**, 155 (1951).
2) Plateau, F.: Arch. de Zool. expér. et gén., 2e série **2**, 144 (1884).
3) Marceau, M. F.: Arch. de Zool. expér. et gén., 5me série **2**, 295 (1909).
4) Bayliss, L. E., Boyland, E. & Ritchie, A. D.: Roy. Soc. Proc. (B), **160**, 363 (1930).
5) 田村正：Sci. Rep. of Tohoku Imp. Univ., 4th series IV, 259 (1929); Ibid., 4th series VI, 347 (1931).
6) 三宅正人：科学, **20**, 519 (1950).

（九州大学農学部水産化学教室）

Résumé

This report also describes the results of the experiments made for research (B) mentioned in Report 1.

In dimyaria, the resultant of the two adductor muscles must be so disposed that there is an equilibrium between that and the action of ligament, and this fact was proved as follows.

The author investigated respectively the action of ligament and the resultant of the two adductor muscles, and examined whether both actions would harmonize with each other.

The behavior of ligament was caught on a kymograph at first, and then the author searched for the position of the temporary resultant of adductors which would correspond to the action of ligament.

On the other hand the position of the true resultant of adductors was obtained by calculation on the ground that the force of adductor is proportional to the area of the cross section of adductor.

It was proved that the two resultants thus obtained occupy almost the same position, and consequently that there is a harmonious action between the ligament and the adductor muscles.

二枚貝の加熱による開殻機構

三　宅　正　人

Mechanism of shell-opening of bivalves by heating

Masato Miyake

九州大学農学部学芸雑誌，第14巻　第2号，別刷，昭和28年9月28日

Reprinted from the Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol. 14, no. 2, September 28, 1953

二枚貝の加熱による開殻機構

三　宅　正　人

Mechanism of shell-opening of bivalves by heating

Masato Miyake

I. 緒　　言

二枚貝を水に投じ加熱すれば 100°C 附近の温度に於て熱の為閉殻筋と貝殻との結合が破れ開殻するに至る．然し開殻はしても貝殻には閉殻筋が残つているのが常である，そして液が煮沸しても此の閉殻筋は未だ殻に附着していることが多い．

貝肉を採取する為行われている蒸煮法は此の現象を利用したものであるが，上述の如く閉殻筋は完全に剝離していない為開殻はしているものの，貝肉の篩別は全く完全には行かないし又殻に残存する閉殻筋の数は相当あるのが普通である．従つてそれ丈は損失となる訳である．

然らば閉殻筋の剝離は果して何度で完全に起るものであろうか？又閉殻筋の位置によつて剝離に難易があり従つて残存する閉殻筋は一定しているものかどうか？之等の問題に関し説明を与えた報告はなく，唯岩田[1]が 50～100°C に至る間の温度に於ける殻の開きの変化を調査し，閉殻筋の剝離温度はバカガイ 76.1°C，アサリ 82.4°C，シオフキ 84.4°C，ハマグリ 90.5°C であることを報告しているに過ぎない．

著者は 50～120°C に至る間に於ける二枚貝の開殻状態の変化に就て更に詳しく調査を行い，閉殻筋の剝離は同時に起るものではなくその位置及び横紋筋，平滑筋の区別によつて異なること，普通の蒸煮法で惹起される閉殻筋の剝離は靱帯の開殻作用を伴つて達せられること及び靱帯の開殻作用なしに閉殻筋自体が殻との結合を解く温度は 120°C であること等を明らかにし，又此の結果から先に報告[2]した如く新しい開殻法へのヒントを得た．

II. 50° より 100°C に至る間に於ける変化

岩田[1]は約 20 分間の加熱により 5° から 100°C になるように温度を上げて開閉殻運動の変化を調査し前記の如き閉殻筋の剝離温度を得たが，この点に関し著者の力学的研究[3,4]より考察すれば決して瞬時に開殻するものではなく，アサリ，ハマグリの如く前閉殻筋が後閉殻筋よりも長さが短いにも拘らず蝶番軸から遠く離れた位置にあるものでは開殻に当つて当然前閉殻筋の方が後閉殻筋よりも伸長しなければならない故*，前閉殻筋が先に剝離すべきであること（a），又同じ閉殻筋の内でも平滑筋部は横紋筋部より殻間の距離の狭い位置に存在するから平滑筋部が先に剝離すべきであること（b）等が考えられる．この内（a）

---

* 生きている場合の開殻とは若干違う．文献（3），（4）参照．

については実際に証明出来ることで 85～100°C の熱湯中に貝を投入し剝離状況を調べて見ると之と一致することが分る．然し実際に貝の吸物を作つた場合は熱水が一様の温度を有するものではなく鍋底から加熱される為熱の受けようが一様でなく，その為その閉殻筋剝離の状態が区々となり上の如く判然とは確認出来ないのである．(b) については事実は之に反し横紋筋部が平滑筋部より先に剝離すると云う新事実が認められた．

例えば1立の各種温度の熱水中に貝を2分間宛入れ閉殻筋の剝離温度を調査した所，最初に剝離する前閉殻筋の横紋筋部の剝離温度はアサリでは 86°C，全部の閉殻筋が剝離し終る温度は 89°C，シオフキでは前者が 85°C，後者は 88°C，ハマグリでは前者が 89°C，後者が 92°C というように前閉殻筋の横紋筋部が最初に低温で剝離し，その後順次後閉殻筋の横紋筋部，前閉殻筋の平滑筋部，後閉殻筋の平滑筋部の順序で剝離し茲で始めて貝は大きく開殻するのである．然し実際には之等の剝離順序並に剝離温度は必ずしも一定していない．之は貝の軟体部の収縮によつて閉殻筋が中央に引寄せられ閉殻筋にかかる張力が大きくなつたりするからである．従つて測定は比較的簡単ではなく，上掲の数値は数例の平均値に過ぎないが，上例の二枚貝では前閉殻筋の横紋筋部が最初に剝離するものであるということを例示したに過ぎない．但し蝶番軸が固定している貝（例えばサルボウ）では両閉殻筋の長さの比と閉殻筋より蝶番軸迄の距離の比が等しいのが普通であるから[3]，この場合後閉殻筋の方が前閉殻筋よりも蝶番軸から遠く離れていても加熱の為開殻した時夫々の伸長される度合は同じ為原則としては同時に剝離すべきである．但しこの場合も横紋筋が平滑筋よりも先に剝離することは同様である．

この原因に就ては閉殻筋の横紋筋の収縮率が平滑筋のそれよりも大きい為か又は閉殻筋と殻との結合力に於て横紋筋の方が平滑筋よりも緩い為に起るのか孰れかであると考えられる．前者の点に就ては横紋筋の収縮率は元来平滑筋よりも大きい所か反つて小さいことが Anthony[5]，Marceau[6] により認められ又著者[4]も確認した所であるが，閉殻筋は熱昏睡の温度に達すると麻痺して最早収縮する力を失いそのまま凝固してしまうのであるから孰れの筋にしても大きい収縮力が働くものとは考えられない．従つて主原因は後者にあると考えられるが著者は次の如くして之を確めた．

即ち閉殻筋を傷付けぬよう注意し乍ら貝の軟体部を除き閉殻筋のみを残した二枚貝に於て，一方の殻の閉殻筋結合部に相当する部分を外側から小火焔で加熱する．この方法により閉殻筋の全体には加熱の影響を与えずに結合部のみに与える影響を知り得る．この実験により単に結合部の加熱のみによつても横紋筋は平滑筋より先に剝離する事実が明らかとなつた．即ち閉殻筋の殻に対する結合力は平滑筋より横紋筋の方が弱い為加熱の際横紋筋の方が先に剝離するのである．或は加熱に対し弱い結合を有すると言つた方が妥当かも知れない．

III. 100°～120°C 間に於ける変化

100°C 以上の温度では二枚貝は勿論大きく開殻するが 100°C 以上の温度に於て閉殻筋の剝離状態が如何様になるかに就ては未だ報告がないようである．よつて著者は次の如き実験を行つた．

1．普通に加熱した場合の閉殻筋の剝離状態

二枚貝 50 個宛を用い加熱時間を 10 分間に規定して一定温度に達せしめて開殻した貝に就き貝柱の剝離状態を調査した.

A. 100°C の沸騰水に貝を投入し全部開殻したら直ちに取出す. 之は対照区で 10 分間加熱しない.

B. 100°C の沸騰水に投入して 10 分後取出す.

C. 予め加熱沸騰せる加圧釜に貝を投入加熱し 10 分後取出す. この場合貝の投入後水蒸気の出る迄に3分を要しその後の加熱7分で 1.4 気圧（110°C 弱）に達した時直ちに蓋を開け貝を取出した。

D. (C) と同様に行い 10 分間の最終時に2気圧（120°C）に達せしめた.

実験結果は第1表に示す.

第 1 表. 高温による開殻状態.

貝の種類		加熱温度 °C.	容易に柱共剝離するもの (1)	3度強く振つて始めて貝肉の落ちるもの (2)	3度強く振つても貝肉の落ちぬもの (3)	備考
アサリ	A	100	14	22	13	空 1
	B	100	23	15	9	〃 3
	C	110	40	7	2	〃 1
	D	120	47	2	0	〃 1
シジミ	A	100	30	10	10	
	B	100	35	10	5	
	C	110	48	2	0	
	D	120	50	0	0	
サルボウ	A	100	未開殻			
	B	100	8	32	10	
	C	118	28	12	10 *	
	D	135	28	12	10 *	

* 柱の極く一部で附着するに過ぎず，之は靱帯の開殻力が弱い為である.

上表の内（1），（2）の項は篩にかけた場合貝肉が落ちるもので（3）の項は落ちずに貝殻に附着したまま篩上に残るものに該当する.（A），（B）は何れも貝柱剝離の不十分であることを示しているが，一般に二枚貝の吸物を食する場合必ず若干の柱が殻に附着して残ることを経験するのはこの（A）で示される如く 100°C では元来柱は完全に剝離しないからなのである. 所が 100°C 以上になると柱の殻に対する結合機能がよりよく破壊され 120°C では殆んど完全に破壊されて貝肉が貝殻より離脱されることが分つた.

2. 閉殻状態を保ちつつ加熱した場合の閉殻筋の剝離状態

（1）の実験による開殻は閉殻筋自体の収縮と靱帯の開殻作用及び閉殻筋と殻との結合が熱によつて破壊されることの3者の共同作用によつて起るものである. 仮りに靱帯の開殻作用を除いた場合，貝柱の剝離は何度で完全に起るかを明らかにする為に次の如き実験を行つた.

貝 50 個宛を用い貝殻を針金で縛り開殻出来ぬようにしてから一定温度に加熱した後，針金を解き貝柱の剝離状態を調査した結果を第2表に示す. 加熱温度は（1）の場合と同じである。

第 2 表. 閉殻筋剝離の状態.

貝の種類	加熱温度 °C	閉殻筋剝離の状態
アサリ	100(10分)	緊縛を解くも開殻しなかつた，即ち貝柱は剝離していなかつた.
	110(10分)	緊縛を解くと貝は全部開殻した，即ち貝柱は既に剝離しているがなお一部殻に残存するものが19個あつた.
	120(10分)	同上，但し貝柱の殻に残存するものは皆無であつた.
シジミ	100(10分)	アサリの場合と同じ.
	110(10分)	緊縛を解くも貝は開殻しなかつた，貝柱は剝離しているが靱帯の開殻作用が弱いのと両殻が密着せる為である.

サルボウはシジミと全く同様の結果を得たので省略した. 以上の実験によつて単なる煮沸位では元来閉殻筋は剝離するものではなく靱帯の開殻作用を伴つて始めて為されるものであること，及び靱帯の開殻作用を伴わないで達せられる完全剝離は 120°C 以上の高温度に於て始めて可能となるものであることが明らとなつた.

IV. 総　　括

1. 加熱による閉殻筋の剝離は一時に起るものではなく，シオフキ，アサリ，ハマグリ等の如く前閉殻筋が後閉殻筋よりも長さが短いにも拘らず蝶番軸から遠く離れて存在する貝では先づ前閉殻筋の横紋筋部が剝離し次に後閉殻筋の横紋筋部，前閉殻筋の平滑筋部，最後に後閉殻筋の平滑筋部の順で剝離することを明らかにした. 蝶番軸の固定した二枚貝では前後両閉殻筋の横紋筋部が同時に剝離し，次に前後両閉殻筋の平滑筋部が同時に剝離するのである.

2. この剝離順序に就ては，加熱により開殻する場合伸長力の余計にかかる閉殻筋が先に剝離すること及び閉殻筋の内，横紋筋が平滑筋よりも先に剝離するのはその筋繊維の殻に対する結合の度合が弱い為であること等を明らかにした.

3. 普通の蒸煮法による開殻は真の閉殻筋剝離によるものではなく靱帯の開殻作用によつて惹起せられる強制剝離であること及び靱帯の開殻作用なしに閉殻筋自体で起る剝離は 120°C に於て始めて達せられること等を明らかにした.

本研究は九州大学農学部水産化学教室に於て行つたもので終始懇篤な御指導を賜つた富安教授に謝意を表する.

文　　献

1. 岩田清二：日水誌，**14**，82 (1948).
2. 三宅正人：日水誌，**18**，373 (1953).
3. 三宅正人：九大農学芸雑誌，**12**，155 (1951).
4. 三宅正人：同上，**12**，165 (1951).
5. Anthony, R. : Bull. Soc. philom. de Paris, 9° série, **6**, n° 3 (1904) (Marceau による).
6. Marceau, M. F.: Arch. de Zool., expér. etgén., 5m série. **2**, 295 (1909).

Résumé

When the bivalves are heated in water, they will open the shells at about 100°C as a result of the breaking of the joint between the adductor muscle and the shell. We usually see that some of the adductor muscles adhere to the shell even in boiling water when the shells have already opened themselves. In the heating process commonly used for obtaining shell-meats, therefore, the adductor muscle is not detached completely and considerable amounts of the remaining adductor muscles go to waste.

The author investigated in detail the changes in the shell-opening with the following results.

The detachment of adductor muscles is accomplished by the co-operation of the opening power of the ligament at a temperature below 100°C, while at a temperature over 120°C the detachment occurs without the action of the ligament.

The detachment of both of the aductor muscles does not occur at the same time. The time of the detachment differs according not only to the position of the adductor, but also to the kinds of the muscle. In *Mactra veneriformis*, *Paphia philippinarum* and *Meretrix meretrix*, in which the anterior adductor muscle is farther apart from the hinge axis than the posterior adductor, the striated muscle of anterior adductor detaches itself at first and then the striated muscle of the posterior adductor, the smooth muscle of the anterior adductor, the smooth muscle of the posterior adductor follow in order.

The author gave the following explanation to these phenomena. The adductor muscle which has received greater tension is detached earlier than the others, and the striated muscle detaches itself earlier than the smooth muscle, since the linking power of the former is weaker than that of the latter.

二枚貝の開閉殻運動に関する生理学的研究（第1報）

温度の影響（其の1）

三宅正人

Physiological studies on the shell movements of bivalves. 1

Effect of temperature. 1

Masato Miyake

九州大学農学部学芸雑誌，第14巻 第2号，別刷，昭和28年9月28日

Reprinted from the Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol. 14, no. 2, September 28, 1953

二枚貝の開閉殻運動に関する生理学的研究（第1報）

温度の影響（其の1）

三宅正人

Physiological studies on the shell movements of bivalves. 1

Effect of temperature. 1

Masato Miyake

I. 緒言

二枚貝は呼吸，採食，排泄等の生理作用に必要な海水を殻中に流入させる為2枚の殻を必要に応じ開閉しているが，この運動に影響を及ぼす諸種の条件を知ることは貝の利用上重要なことで，例えば食用に供しようとする貝が不潔な海水の為汚水病源菌が貝の体の内外に附着した場合，新鮮な海水中に之を移し且つその開閉殻運動を盛ならしめるような条件とか刺戟を与えて，新鮮な海水を外套腔内に流入させ自ら浄化作用を為さしめることが出来るものである．日本人のように魚貝類を生食する国では殊にこの種の研究が必要と思われる．*又産業上重要な貝であるカキのように移動性を持たない貝では開閉殻運動が外部から見える唯一の運動であるから殊にその観察は重要となる．従つて二枚貝の開閉殻運動に関する研究は比較的多い．

本研究は富安及び著者の考えた化学的貝開殻法[1]——化学的に二枚貝を処理して閉殻筋を殻から遊離させることにより，貝をして開殻せしめると同時に遊離した剝身を簡単に採取する方法——を改良する目的をもつて行われた開閉殻運動に関する生理学的基礎実験を主とするものである．

貝を薬品溶液に浸漬する時は，元来貝が不利な環境に置かれた場合完全に閉殻する性質によつて液の殻内への侵入が妨げられる為，開殻に要する時間が長くなり，又貝肉が変質する等色々不利な点を生じて来る．然るに若し貝をして予め少しく開殻せしめることが出来るならば，液の侵入も速かとなり開殻及び貝肉の剝離に要する時間を著しく短縮せしめることが出来るであろう．

著者は二枚貝の開閉殻運動に関し逐次報告するような基礎的実験を行つて種々の新知見を得た．又この研究の結果を化学的開殻法の改良にも利用することが出来た．[2,3,4]

II. 常温に於ける開閉殻運動

二枚貝の開閉殻運動に関する研究はカキに就て行われたものが最も多く，Nelson,[5] Galtsoff,[6] Hopkins,[7] 田村[8]等によつて研究が開始され，その他の二枚貝に就ては *Venus mercenaria* L., *Mytilus edulis* (L.) に就てLoosanoff,[9,10] アカガイに就て松

---

* 但しこの場合開閉殻運動のみでなく，鰓上皮の繊毛活力をも好適ならしめることも必要である．

谷,[11] アコヤガイに就て小林，東畑,[12] 又各種の二枚貝に就て Marceau[13,14] が夫々観察しているが，アサリ，シオフキに関してはないようである.

著者は常温に於ける貝の開閉殻運動に於て未だ明らかにされていないアサリ，シオフキの運動を調査し，その生態を若干明らかにし得たので以下に記述する.

i. 実 験 の 部

実験方法：開閉殻運動はキモグラフを用いて記録した. 貝を固定する方法としては，Marceau[13] は金属板上に poix de Bourgogne を以て，Hopkins[15] は焼石膏と砂を以て，Galtsoff[6] は煉瓦の上にセメントと焼石膏との混合物を以て，Loosanoff[9] はコンクリート板上に砂とセメントの混合物を以て，岩田[16] は板に針金を以て固定している. 著者は金属類の影響を避ける為素焼板の上に焼石膏を以て固定し，又運動の拡大装置用槓杆への接続には僅少の銅線を用いた. 著者の使用した記録装置の全容は Fig. 1 の如くである.

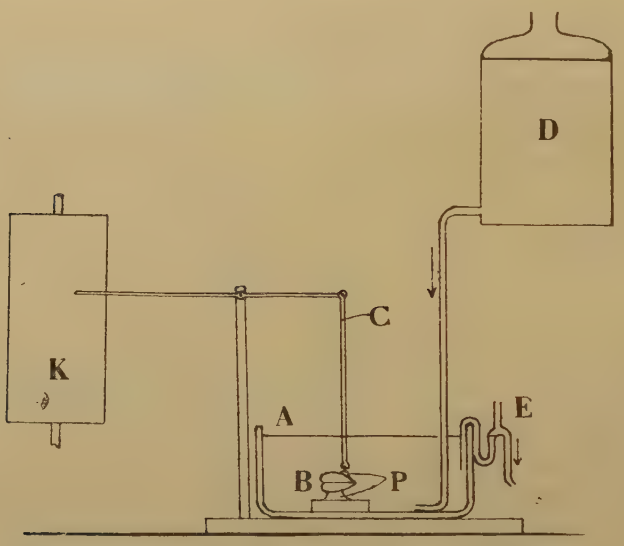


Fig. 1. 開閉殻運動記録装置.
A. 水槽. B. 二枚貝. C. 運動拡大用槓杆. D. 海水貯槽.
E. 海水面調節装置. K. キモグラフ. P. 石膏.

海水は博多湾で採取したもので S.G. 1.025 (20°C) であつた. 濁つている時とか浮遊物のある時は静置して上澄液を用いた. 海水の流入速度は大体 1 *l*/hr. 供試貝は採取直後のものを用いた.

実験結果：

A. 正常の開閉殻運動

a. アサリ ***Paphia philippinarum*** (Adams et Reeve), (博多湾産)

1. 24 時間運動 (19～24°C)

Fig. 2 に 4 例を示したが，その他の実験例に於てもアサリは (b) に示すシオフキと

異なり1日に少くとも1回は完全に閉殻する．而して運動の規則性及び昼夜の別は認められなかつた．

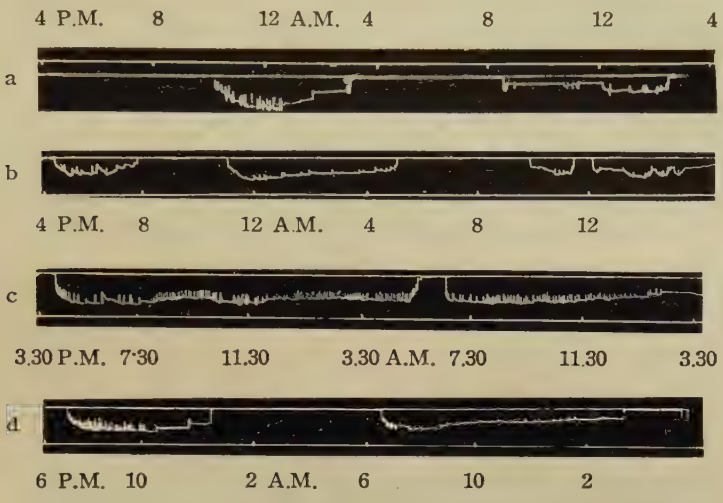


Fig. 2. アサリの24時間運動 (19～24°C).

a．殻長 3.36 cm 温度 21～24°C 年月日 10.3. '49
b．〃 3.57 cm 〃 21～24°C 〃 10.3. '49
c．〃 3.35 cm 〃 22～23°C 〃 10.4. '49
d．〃 3.45 cm 〃 19～23°C 〃 10.7. '49

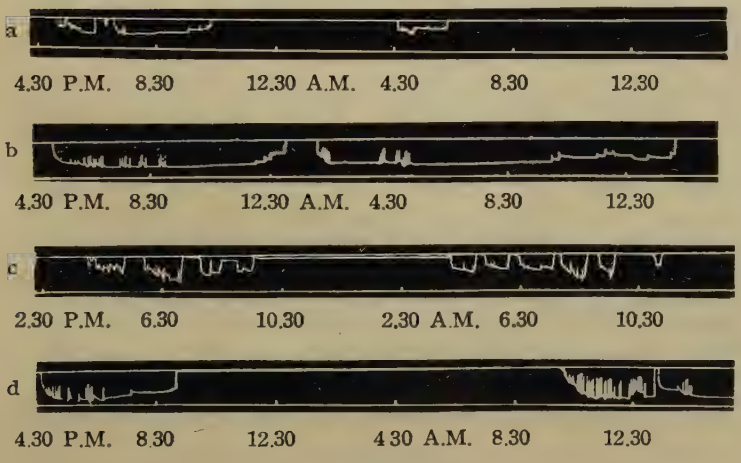


Fig. 3. アサリの24時間運動（7～15.5°C).

a．殻長 3.20 cm 温度 13～15.5°C 年月日 11.30. '49
b．〃 3.18 cm 〃 13～15.5°C 〃 11.30. '49
c．〃 2.85 cm 〃 7～10.5°C 〃 12.15. '49
d．〃 3.27 cm 〃 12.5～15°C 〃 12. 1. '49

2． 24 時間運動（7～15.5°C）

Fig. 3 に示す．低温では運動が不活潑となり完全閉殻の時間が長くなるか又はその回数が多くなることが認められた．

3． 1時間運動（17°C）Fig. 4 に示す．閉殻は速かであるが開殻は緩かに起ることが示されている．

b． シオフキ *Mactra veneriformis* Reeve,（博多湾産）

1． 24 時間運動（24～27°C）

Fig. 5 に4例を示す．アサリと異り 24 時間中絶対に閉殻することがない．開閉殻運動の規則性，昼夜の別はその他の例に於ても認められないようであつた．

2． 24 時間運動（9～15.5°C）

Fig. 6 に 2 例を示す．低温では運動が非常に緩かで且つ常温に於ける閉殻時の鋭さが消失していることが認められる．

B． 非正常の場合の開閉殻運動

以上の実験例は標準状態に於ける開閉殻運動を示したのであるが，貝が次第に弱まつて

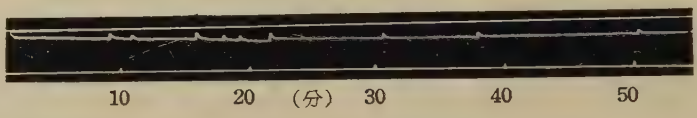


Fig. 4. アサリの1時間運動.
殻長 2.94 cm 温度 17°C 年月日 11. 14. '49

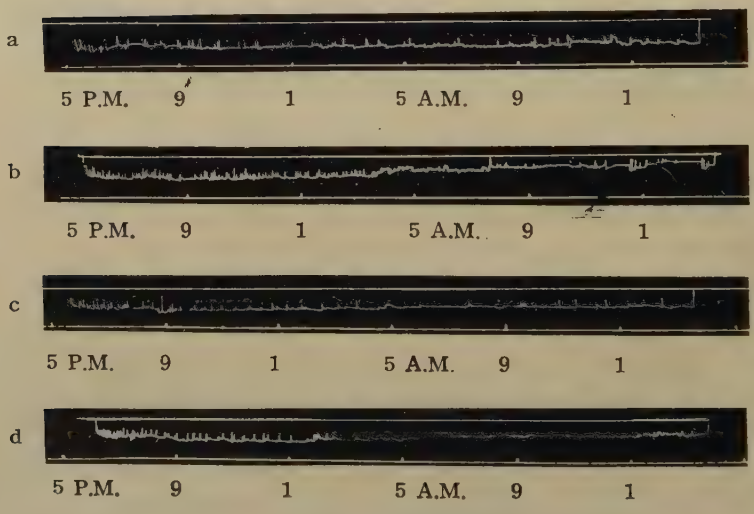


Fig. 5. シオフキの24時間運動（24～27°C）.
a． 殻長 3.50 cm 温度 25～27°C 年月日 9. 13. '49
b． 〃 3.40 cm 〃 24～26.5°C 〃 9. 14. '49
c． 〃 3.35 cm 〃 25～27°C 〃 9. 15. '49
d． 〃 3.40 cm 〃 25～27°C 〃 9. 15. '49

行く場合とか又は空中に露出した場合の如く非正常の状態に置かれた時は次の如く変つた運動を示す.

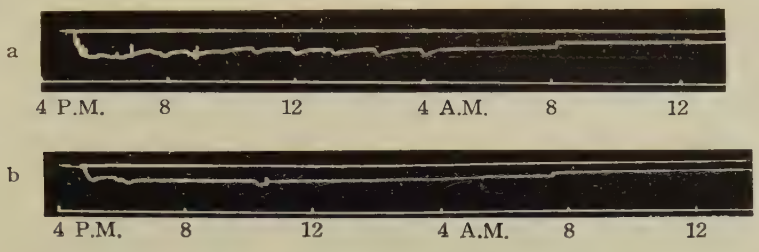


Fig. 6. シオフキの24時間運動（9～11.5°C).

a．殻長 3.95 cm 温度 9～11.5°C 年月日 12. 16. '49
b．〃 4.00 cm 〃 9～11.5°C 〃 12. 16. '49

a．採取直後より死亡する迄の連続運動記録

1．アサリ ***Paphia philippinarum*** (Adams et Reeve),（博多湾産）

Fig. 7 に示すように連続10日間の記録によるとアサリは弱まるにつれ閉殻の全期間が短くなり且つ段々開閉殻運動の振巾が小さく鈍角的な運動となり——⊔⊔の形の鋭角的な運動が⋀⋀のように稍鈍角的な運動となる——更に進むと∩∩のように一層鈍角的な運動を示すようになる．之は更に微弱な運動に転移し最後には最早運動を呈しないようになる.

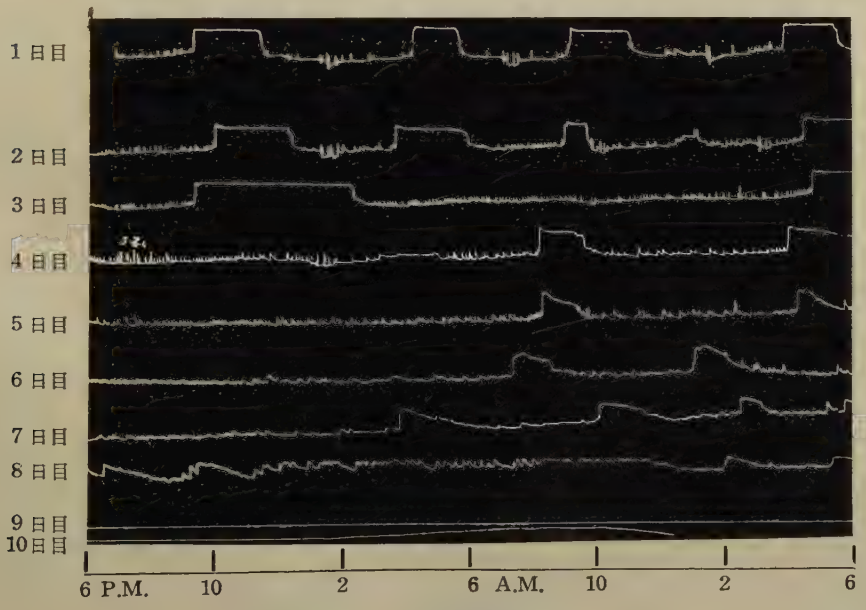


Fig. 7. アサリの連続運動記録.
殻長 3.2 cm 水温 27～32°C 年月日 7. 19～28. '50.

2．シオフキ ***Mactra veneriformis*** Reeve,（博多湾産）

Fig. 8 に示す如く開閉殻運動は漸次激しくなるが，その後その振巾が小さくなり遂には

途絶えたまゝ開閉殻運動をしないで死亡するに至る．而してその間閉殻することがない．5日目左端の矢印の点では外套膜及びサイフオンがなお反応した．

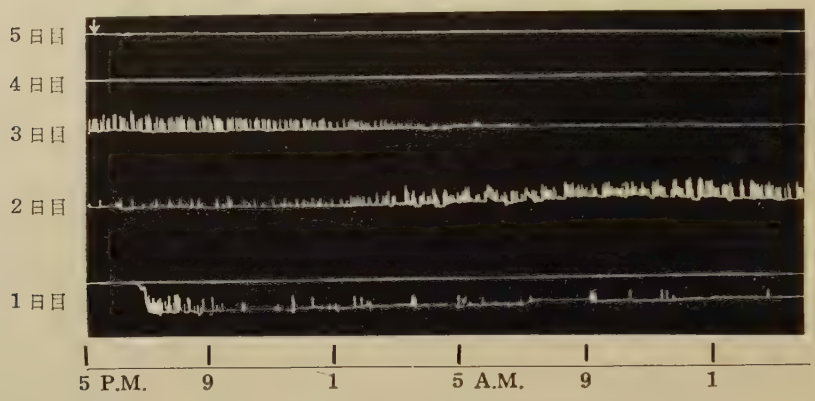


Fig. 8. シオフキの連続運動記録．
殻長 3.75 cm 水温 27～31°C 年月日 7.29～8.2, '50

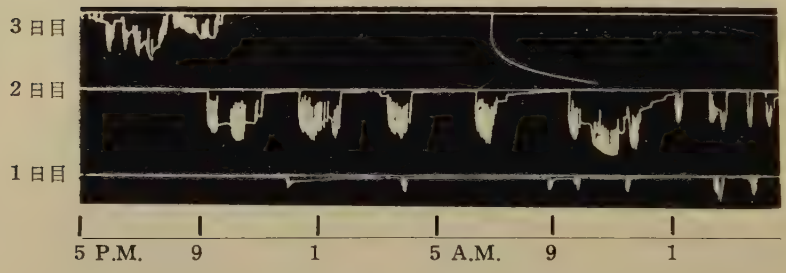


Fig 9. 空中に露出したアサリの連続運動記録．
殻長 3.12 cm 室温 26.5～33.5°C 年月日 8.21～23, '50

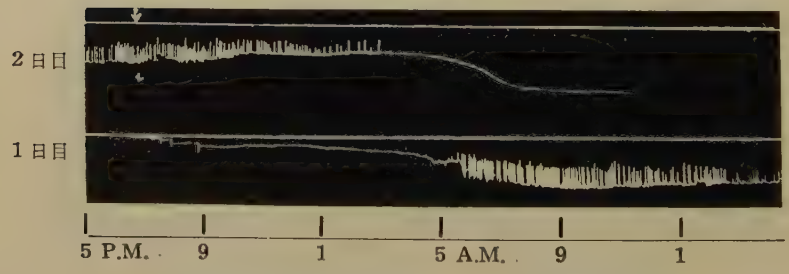


Fig. 10. 空中に露出したシオフキの連続運動記録，
殻長 3.50 cm 室温 26～32°C 年月日 8.23～24, '50

6．空中に露出した場合の運動記録

Figs. 9 及び 10 に示す．この場合貝の体の水分蒸発を防ぐ為アサリでは元気な間は長時間に亘つて閉殻を行い弱つてもなお出来る丈閉殻を維持しようとする傾向が見られるに反

し，シオフキでは閉殻せずに入水孔及び出水孔を閉ぢ且つ左右外套膜縁を伸して閉鎖することにより，その目的を達していることが観察された．然し貝体が弱まると閉ぢた外套膜縁に隙間が出来る (Fig. 10, 2日目の左端矢印より以降)．

ii. 考　　察

実験結果について考察して見るに，いづれの貝も Marceau[13,14] が認めた如く運動記録の始めは非常に振巾が大きく後徐々に小さくなつているが，之は殻中に含まれた砂や排泄物を速かに出す為であることを著者は認めた．

アサリとシオフキに於ける大きな差異は，前者は屢々完全閉殻を行うのに反し後者は開殻したまゝでいる点である．シオフキが開殻を続けようとする性質は特異なもので，空中に露出した場合の如く生存上甚だ不利な環境に置かれても，なお閉殻しようともしないで或る程度開殻したまゝ開閉殻運動を継続する．この現象を閉殻筋の機能から考えると，シオフキでは閉殻筋の平滑筋部が横紋筋部に比して僅少の割合を示して居り閉殻を維持する能力が微弱であるが，アサリでは平滑筋部がよく発達しており長時間の閉殻に堪えるようになつているので上記のような現象が見られるのである．

両貝共不規則に起る律動的な部分的閉殻が見られるが Nelson[5] はカキの場合屢々起る部分的閉殻は濾しわけた沈澱物の排泄の為起るものと考え，Galtsoff[6] は食餌していない場合のカキに於て，律動的な部分閉殻には不必要な濾過物や排泄物の排泄を伴わないことを認め，之は色々の刺戟例えば機械的なもの，照明の変化，pH 及び瓦斯量の変化，化学物質の存在等に影響されると述べたが，之に対し Orton[17] は此の種の刺戟が実験中に起ることを疑問とし，鰓の端から粘液の連結物を外套腔内に切離す為迅速な部分的閉殻が起る時もあるが，律動的の部分閉殻は閉殻筋の Catch component の疲労を戻す為 Motor component により行われる救助的収縮によるものと考えた．Hopkins[18] は *O. gigas* に就て観察し体の内部的原因（普通の排泄）と外部的原因（水中の懸濁物等の排泄）によるものとに分けた．著者はアサリ，シオフキの場合小さい粘液性連結物は殻運動なしに出水孔から水流の作用のみにより排泄せられること，部分閉殻時には時折砂や其の他の排泄物を排泄することもあるが全然出ないこともあること，及び完全閉殻は一般の排泄等に関係なく起るものであること等を認めた．

運動の規則性，昼夜の別は一般に大体認められていないように，アサリ，シオフキに就ての著者の実験でも認められなかつた．又個体差は相当あることが認められた．温度との関係に就ては，適温ならば運動が活潑であつて温度が低下するにつれて不活潑となり閉殻の傾向が増加することはカキ[6,7,15] その他の二枚貝[9,12] に於て認められているが，著者の実験によればシオフキでは 10°C 附近に下ると運動が非常に緩かな特徴のある運動に変るが閉殻はしないこと，アサリでは運動そのものゝ形は変らぬが全体として不活潑となり又閉殻の総期間が長くなる傾向が見られた．非正常の場合，貝が死亡する迄の開閉殻運動の記録を見るとシオフキとアサリでは次のような差が目につく．即ちシオフキはアサリよりも元来弱いらしく干潟より採取したものは常に早く死亡するが，上記の実験例でも示されるように2日目から運動に異常を来たし 5日目に死亡している．アサリでは3日目辺りから異常となり4日目にはサイフオンを長く伸ばし 10 日目に死亡しているが，異常の変化は

アサリに於て顕著に現われている．シオフキは元来閉殻する機能が発達していない為，閉殻筋の機能が弱まつて来れば開殻したまゝ死亡するが，アサリでは閉殻する機能に重点が置かれている為，閉殻筋の機能が衰弱して来てもなお閉殻しようとする努力の跡が見え運動はシオフキのそれとは著しく異なつて来る．即ち横紋筋と平滑筋の機能が共々に疲労して来て各々の機能を明確に発揮出来なくなる為，運動が不分明なものとして記録されるのであろう．

空中に露出した場合には前記の如く体水分の蒸発を防ぐ為，シオフキは外套膜縁を伸して閉鎖する点が特異的である．その他両貝共開閉殻運動の激しい点は一致しているがこの現象の生理的意義は不明である．

なお干潟より採取した直後の貝でも上に示した非正常の場合の運動に類似した運動の見られることがある．之は何等かの原因により既に貝が異常状態にあることを察知せしめるもので，斯かる運動を示すものは正常の実験例中には入れるべきではないと考える．

III. 常温より 50°C に至る間に於ける運動

常温から 100°C に至る間に於ける二枚貝の開閉殻運動に就ては岩田[16]の報告があるのみである．同氏の実験では約 20 分間の加熱により 5°C から 100°C になるように温度が上げられているが，温度の上昇速度が比較的大きい為運動の細かい点を観察するには不適当と思われたので，著者は約 60 分間で 15°C から 50°C 迄温度を上昇せしめる緩かな加熱をを行い開閉殻運動の変化を詳細に観察した．

i. 実 験 の 部

実験方法：加熱法としては直火を避け Fig. 1 の装置を用い．温水を海水貯槽（D）から流し水槽（A）の温度を上昇せしめる法によつた．

実験結果：各種の二枚貝に就て得られた運動の記録は Fig. 11 に示す．即ちアサリ，ハマグリでは 32°C 附近で一度閉殻状態に入り 41～42°C になると熱昏睡により閉殻筋が麻痺して開殻し始めることが認められる．シオフキ，サルボウでは之に反し 36～37°C で運動が停止して熱昏睡による開殻が始まる．孰れの貝に於ても 30°C 前後に於て開閉殻運動が一時激しくなる．

ii. 考 察

二枚貝の筋肉蛋白が凝固するのは Bernsteine[19]によると 45～46°C，Kruckenberg[20]によると *Pecten jacobäus* は 42°C より，*Mytilus galloprovincialis* では 52°C，清水[21]はハマグリの肉蛋白は 40°C 附近より第1段の熱凝固が始まることを報告している。致死温度に就ては Henderson[22]は 18 種の斧足類に就て致死温度を測定し，シオフキ類は 37°C 附近，アサリ類は 43°C 附近であると述べている．倉茂[23]は朝鮮産アサリの夏季に於ける高温に対する致死温度は 44°C 前後にあること，水温 37～38°C で 4 時間前後浸漬しても殆んど障害のないこと，温度に対する抵抗力は時期により可成りの差があることを述べている．

著者の実験結果は大体上記の諸研究者の結果と一致している．即ちシオフキ，サルボウ

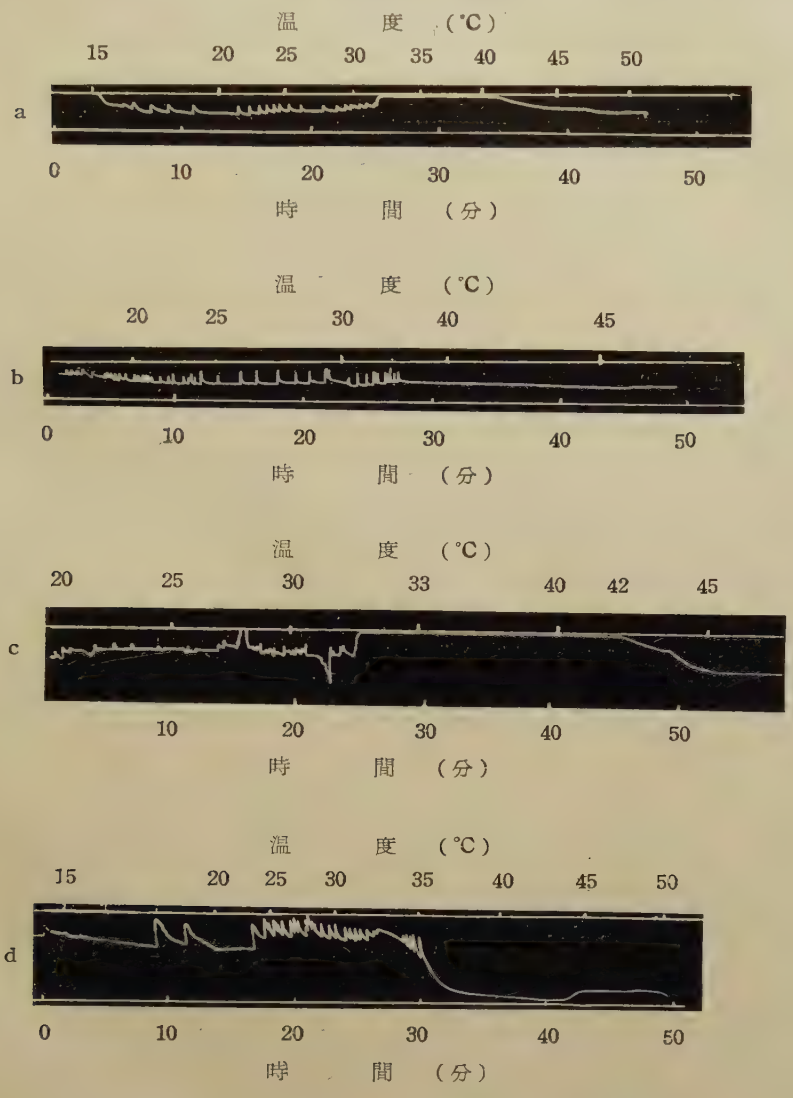


Fig. 11. 常温より 50°C に至る間に於ける開閉殻運動の変化.

a. アサリ（博多湾産）	殻長	3.43 cm	11. 12. '49
b. シオフキ（ 〃 ）	〃	3.52 〃	〃
c. ハマグリ（ 〃 ）	〃	5.02 〃	6. 8. '50
d. サルボウ（有明海産）	〃	4.85 〃	11. 10. '49

は 36～37°C 附近より，アサリ，ハマグリは 41～42°C 附近より熱昏睡により開殻したまゝの状態となる．この状態では早期に常温の海水に戻せばやがて恢復し得るが遅きに失すると最早恢復出来ずに死ぬことが認められた.

IV. 総 括

1. 未だ研究されていないアサリ，シオフキの常温に於ける開閉殻運動を調査した.

i. アサリは 24 時間中に数回完全に閉殻するが，シオフキは1回も閉殻しない.

ii. 両貝共運動に規則性は認められない.

iii. 低温ではアサリの開閉殻運動は不活潑となり閉殻の総期間が長くなる傾向が見られるが，シオフキでは非常に緩かな鈍角的な運動を呈する.

2. アサリ及びシオフキが死亡する迄の期間に於ける運動の変化及び空中に露出した場合の運動の変化に就て調査し，両貝の運動に於ける相違点及び非正常の環境に於ける両貝の特異な運動状態を明らかにした.

i. シオフキは空中に露出した場合の如く甚しく不利な環境に於てもなお閉殻しない.その代り外套膜縁を伸して体水分の蒸発を防いでいる. 一方アサリは出来るだけ閉殻に努めている.

ii. アサリはシオフキよりも生活力が旺盛であるが，衰弱して来ると平滑筋及び横紋筋の作用が明確を欠くようになり，開閉殻運動は漸次不分明なものとなる.

3. 常温より 50°C 迄温度を緩かに上昇せしめた場合アサリ，シオフキ，ハマグリ，サルボウの開閉殻運動が如何に変化するかを調査した. なお感受性を失い熱昏睡に陥る温度は夫々に特有なものであることを認めた.

本研究は九州大学農学部水産化学教室に於て行つたもので終始懇篤な御指導を賜つた富安教授に衷心謝意を表する.

文 献

1. 富安行雄，三宅正人：醱工，**27**，109 (1949).
2. 三宅正人：日水誌，**18**，208 (1952).
3. 三宅正人：同，**18**，213 (1952).
4. 三宅正人：同，**18**，373 (1953).
5. Nelson, T. C.: Rep. Dept. of Biol., New Jersey Agric. College Exp. Sta., for Year ending June 30, 1920 (1921): 317 (Loosanoff[9]) による).
6. Galtsoff, P. S.: Bull. Bur. Fish., **44**, 1 (1928).
7. Hopkins, A. E.: Ibid., **47**, 1 (1931).
8. 田村 正：Sci. Rep. of Tohoku Imp. Univ., 4th series, **IV**, 259 (1929).
9. Loosanoff, V. L.: Biol. Bull., **76**, 171 (1939).
10. Loosanoff, V. L. Anat. Rec., **81** (4): Suppl., 110 (1941).
11. 松谷善三：動，**53**，139 (1941).
12. 小林新二郎，東畑正敏：日水誌，**14**，200 (1949).
13. Marceau, M. F.: C. R. Acad. Sc. Paris, **142**, 1294 (1906).
14. Marcean, M. F.: Arch. de Zool. expér. et gén., (5) **2**, 295 (1909).
15. Hopkins, A, E.: J. exp. Zool., **64**, 469 (1933).
16. 岩田清二：日水誌，**14**，82 (1948).
17. Orton, J. H.: Sci. N. S., **82**, 105 (1935).

18. Hopkins, A. E. : Physiol. Zool., **9**, 498 (1937).
19. Bernsteine, J. : (Fürth : Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere (1903) による).
20. Kruckenberg : (Fürth による).
21. 清水 亘：日水誌, **12**, 104 (1943).
22. Henderson, J. T. : Biol. Abst., 5-II, 1901 (1931).
23. 倉茂英二郎：植物及動物, **9**, No. 12, 522 (1941).

Résumé

The studies, described in this report and those that are to follow, consist of the physiological experiments on the shell movents with the purpose of improving the method of "Chemical Shucking" devised by Y. Tomiyasu and the author, based on the idea that the adductor muscles might be detached very easily with chemicals, after the shell has been opened a little by a physiological treatment.

The results mentioned in the present paper are as follows.

1. The shell movements of *Paphia philippinarum* and *Mactra veneriformis* at ordinary temperature were investigated.

a. In *Mactra*, the shells were kept open continuously during 24 hours, while in *Paphia*, the shells were perfectly closed several times during 24 hours.

b. There was no regularity in movements in either of them.

c. The movements of *Mactra* became dull and inert as the temperature lowered, while those of *Paphia* became inert with the lengthening of the total period of the closure (Figs. 3 and 6).

2. The changes in the movements until death, and those out of water, were investigated, and the difference between the movements of *Paphia* and those of *Mactra*, as well as the charateristic movements of both shell-fishes, was recognized distinctly (Figs. 7 ~10).

a. In *Mactra* the shells were still opened even in an unfavourable condition such as the exposure in the air, and the evaporation of moisture from the body was prevented by closing together the borders of the mantles, while in *Paphia* the shells were closed longer than in normal cases.

b. *Paphia* was more active than *Mactra*, but as it grew weak, the respective function of the smooth and striated muscles became unstable and indistinct.

3. In the case of raising the temperature from the room temperature to 50°C at a rate of 1 °C per 2 min., the shell-fishes lost sensibilities and fell into heat coma at a certain temperature respectively. The temperature at which the shell-fishes lost their irritability and fell in to heat coma, was about 37°C in *Mactra veneriformis* and *Anadara subcrenata*, and about 42°C in *Paphia philippinarum* and *Meretrix meretrix* (Fig. 11).

二枚貝の開閉殻運動に関する生理学的研究（第2報）

エチル・アルコールに対する反応

三　宅　正　人

Physiological studies on the shell movements of bivalves. 2
Behaviour of shell-fish to ethyl alcohol

Masato Miyake

九州大学農学部学芸雑誌，第14巻　第2号，別刷，昭和28年9月28日

Reprinted from the Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, vol. 14, no. 2, September 28, 1953

二枚貝の開閉殻運動に関する生理学的研究（第2報）

エチル・アルコールに対する反応

三　宅　正　人

Physiological studies on the shell movements of bivalves. 2
Behaviour of shell-fish to ethyl alcohol

Masato Miyake

I. 緒　　言

アルコール類の魚貝類に対する作用に関する研究は極めて少く魚類に対しては Otto [1] 及び Führer [2] の研究，貝類に対しては Führer [2] の研究があるに過ぎないようである．Führer [2] は魚貝類を用い室温，1時間にて麻痺に陥らしめる1価の各種アルコールの濃度を比較調査し，二枚貝のホタテガイ及びマテガイの類に対してエチル・アルコールの1.5％（重量）溶液は麻痺に陥らしめる力のあることを報告している．実用的の面では米国でアルコール又は炭酸瓦斯によりカキを少しく開殻せしめて置き次にその刺身を採取する方法が考えられたとのことである．[3]

之等の事実から貝がアルコールにより麻痺せしめられ開殻することは明らかであるが，著者は之を利用して化学的刺身採取法 [4] を改良しようと考えアサリ，シオフキに就て具体的に之等の事実を調査した．又エチル・アルコールによつて開閉殻運動が如何様に変化するか並にアルコールにより麻痺せしめられるに至る経過を観察して興味ある事実を見出した．

II. エチル・アルコールによる貝の開殻及び麻痺の状態

A. 実 験 方 法

アサリを容量％で 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 40, 60 のエチル・アルコールを含む3％食塩水溶液中に浸漬し，又シジミに対しては上と同じ割合の但し食塩を含まぬアルコール水溶液中に於ける行動を夫々観察した．但しアサリ，シジミ共に4％以上のアルコール濃度では必ず閉殻してしまう為アルコールの影響を知り難いので，予め木片を貝殻の間に挿入し少しく開殻せしめて置いた貝を各溶液に浸漬し，この処置を施さぬものと比較対照してアルコールの影響を明らかにした．次に貝 20 個宛を用い試験した結果をしるす．

B. 実 験 結 果

結果は第1表に示した．アサリに於ては麻痺状態に陥つて開殻するのは2～3％の濃度のもので処理した場合が早く7～15 時間で麻痺して少しく開殻するが4％以上の濃度になると貝が閉殻する為殻間を通つて内部にアルコールの侵入するのが遅くなり従つて麻痺に

達する時間が反対に長くなり30時間後に漸く4%及び5%液中浸漬のアサリが麻痺に陥り少しく開殻する．但しこの場合の麻痺による開殻状態は著者の目的とする化学的開殻法の改良には応用し得ない．何となれば大半の貝は閉閉したまゝ麻痺状態に陥つているからである．20%以上の濃度になると少量のアルコールの侵入すらも致命的になるらしい．

第1表．　アサリ及びシヾミに対するエチル・アルコールの影響．

アルコール%（容量）／貝の種類	1	2	3	4	5	7	10	15	20	40	60
アサリ（常態）	開 マヒせず	開 7～15時間でマヒ	半開	閉	閉	閉	閉	閉	閉 10時間で死亡	閉	閉 6時間で死亡
アサリ（開殻せしめたもの）	同上	同上	同上	6～10時間でマヒ	4.5～5時間でマヒ	2～3時間でマヒ	1～1.5時間でマヒ	40～50分でマヒ	20分でマヒ	1分でマヒ	—
シヾミ（常態）	開 マヒ状態判然としない	開 同左	開 その後段々閉ぢる	半開 同左	閉	閉	閉	閉 40時間で死亡	閉 4時間で死亡	閉 2時間で死亡	閉 1時間で死亡
シヾミ（開殻せしめたもの）	—	4時間でマヒ	60～75分でマヒ	—	30～40分でマヒ	—	20～30分でマヒ	12～20分でマヒ	10～15分でマヒ	1～1.5分でマヒ	30～60秒でマヒ

表中のマヒと云う言葉は反応がなくなつた状態を指すのであつて純粋の意味の麻痺とは限らない．

シジミの場合に於ても大体同様のことが認められた．即ち3%位迄は最初開殻しているが，麻痺に陥ると漸次閉殻し4%以上では閉殻のまゝか或はそれに近い状態で麻痺を経て死亡する．予め開殻せしめて置いた場合はアルコール濃度と麻痺との関係が判然とす．然し生態のままでは前記の如く麻痺状態は判然としない．孰れの貝に於てもFühner[2]の実験結果に比して麻痺に陥らしめるアルコール濃度は高い値を示している．

III. アルコールによる開閉殻運動の変化

A. 実験方法

第1報[5]と同様の方法を以てキモグラフに記録して調査した．但し最初から含アルコール海水中に貝を入れると閉殻してしまうので，普通の海水中に貝を入れて置いて徐々に含アルコール（1.5% 重量）海水を注加するようにした．従つて一定濃度のアルコール濃度になる迄には可成の時間を要した．

B. 実験結果

貝がアルコールにより麻痺せしめられる過程をその開閉殻運動の変化から観察すると興味ある現象が見られる．観察した結果を Fig. 1 に示す．

即ちアルコール液を注入し始めてから後の開閉殻運動はアサリ，シオフキ共に恰も酩酊したような感じの非常に不規則な運動に変る．アサリではA点で1.5%アルコール海水

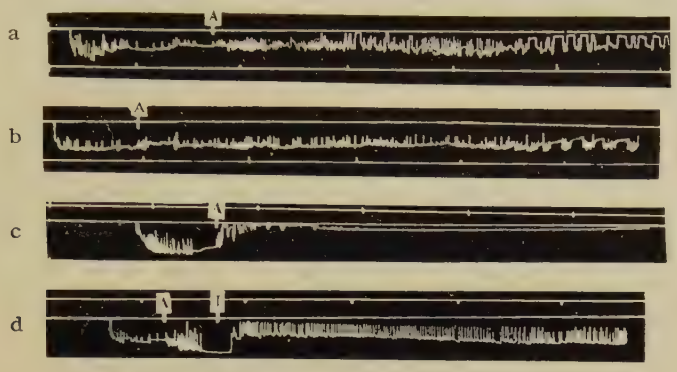


Fig. 1. 開閉殻運動に及ぼすアルコールの影響.

a．アサリ， A点は1.5％アルコール液を注入し始めた時を，上の線は閉殻時を，下の線は時間を示し，時間は4時間毎に区切つてある．21～23°C.

b．シオフキ， 同上.

c．アサリ， 10％アルコール液をA点より注入，21～23°C.

d．シオフキ， 同上．T点は外套膜に触れても反応を示さなかつた時を示す．以後普通の海水を注入し貝を恢復せしめた状態を示した.

を注入後4時間目位から，シオフキでは4～8時間目位から常態の開閉殻運動* と全く異つたものになることが観察された.

次に 10 % アルコール海水による麻痺の状態を見るとアサリとシオフキでは少しく異る．即ちアサリは一度閉殻した後徐々に少しく開殻して来るがシオフキでは大きく開いてしまう．シオフキの記録では麻痺後海水を流した為貝の恢復して行く状態が示されているが，この場合の運動は標準状態のそれに比して激しいものである.

IV. 摘 要

1．化学的剝身採取法改良の目的を以てアサリ，シジミ，シオフキのエチル・アルコールによる麻痺状態を調査した.

2．貝を普通の状態に置いたまゝでアルコールによる影響を調べると，液中ではその濃度が高まるにつれて閉殻する傾向がある為反つて麻痺に陥る迄の時間が長くなる．然し閉殻出来ぬように予め木片等を殻間に挿入して置いた貝では，麻痺に要する時間とアルコール濃度とは反比例することが明らかに認められた.

3．アルコールにより開閉殻運動が如何様に変化するかを調査し，低濃度のアルコールでは非常に不規則な変つた開閉殻運動を示すこと，麻痺に陥る状態はアサリでは一度閉殻した後麻痺により少しく開殻して来るがシオフキでは大きく開いてしまうこと等を認めた.

---

* 文献（5）参照.

本研究は九州大学農学部水産化学教室にて行つたもので富安教授の懇篤な御指導に対し謝意を表する.

文 献

1. Otto, G. : Z. f. Biol., **59**, 165 (1913).
2. Führer, H. : Z. f. Biol., **57**, 465 (1912).
3. Prytherch, H. F. : The Scientific Monthly, **38**, 118 (1934).
4. 富安行雄, 三宅正人 : 醱工., **27**, 109 (1949).
5. 三宅正人 : 九大農学芸雑誌, **12**, 155 (1953).

Résumé

The shell-fish opens the shells a little when paralysed by alcohols. The author, therefore, intended to improve the method of "Chemical Shucking" on the basis of this fact, and investigated how the shell movements of *Paphia philippinarum*, *Corbicula leana* and *Mactra veneriformis* would be changed with ethyl alcohol and how the resulting paralysis would happen, and found out the following facts.

In normal states, the shell-fishes have a tendency to close the shells as the concentration of alcohol increases, and therefore the time required for paralysis becomes longer.

In the shells opened a little by inserting a wood wedge between them, however, the time needed for paralysis is inversely proportional to the concentration of alcohol.

Very irregular shell movements are recognizable at low concentration of alcohol, and the states at which the paralysis begins in *Paphia* and *Mactra* differ from each other as is shown in Fig. 1.

水の微量分析法に關する研究

第9報※ 水の硬度の微量定量法

Studies on Micro-chemical Methods for Water Analysis

IX* A micro-method for the determination of hardness of water.

富山哲夫・大町登美子

T. TOMIYAMA and T. OMACHI

(九州大学農学部水產化学教室)

The present paper deals with a modified procedure for the determination of hardness of water according to the soap method.

Pour 10 cc of a sample water into an aeration vessel shown in Fig. 1. Titrate with the soap solution while being bubbled by an air diffuser which is made of either sintered glass or silk cloth. Finish the titration when the formed lather will completely cover the surface for one minute after stopping the aeration.

The determination of hardness of barium chloride solution according to the micro and the macro procedures showed concordant values between these two procedures. In case of a calcium salt solution, a linear relation exists between the titer and the hardness over a hardness-range between 1 and 8. In case of magnesium sulfate solution, a noticeable discrepancy has been observed between the experimental and the theoretical. It has been found, however, that this abnormality can be removed by the addition of ethyl alcohol. A greater value for hardness of about 10 per cent was obtained in an equal mixture of calcium and magnesium sulfate. The values for hardness of various fresh waters obtained according to the micro procedure showed in average a deviation of about 8 per cent from values for total hardness calculated from calcium and magnesium contents.

1. 緒　　言　硬度の定量にはカルシウム及びマグネシウムの定量値より計算する方法[1]，ソーダ試藥法[1]，パルミチン酸加里法[2]，石鹸法[1]等が用いられているが，野外での簡易定量法としては石鹸法が適していると思われるので，この方法の少量化を企てた。マクロ法では 5～100 cc の供試水を必要とするから，之を 5～10 cc に少量化し，また操作を簡單にして定量時間をも短縮できるように工夫を試みた結果，野外での定量法としては充分の精度が得られたので，こゝに報告する次第である。

2. 裝置及び定量法　定量の原理は石鹸法と全く同じであるが，滴定終点を判定し易くする目的から，滴定中に振盪する代りに微細な空氣泡を液内に通じつゝ滴定する方法を採用した。

(昭和 24 年 8 月 1 日受理)

* I. The micro-volumetric determination of oxygen, alkalinity and chloride in water. (Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, **13** (1937) 1007). II. A new micro-method for the estimation of oxygen consumed from permanganate. (*ibid.*, **13** (1937) 1017). III. A new portable colorimeter. (*ibid.*, **14** (1938) 187). IV. A study on the method for determining oxygen consumed from permanganate. (Jap. J. Limnology, **8** (1938) 314). V. A new colorimetric method for the determination of dissolved oxygen. (*ibid.*, **10** (1940) 68). VI. The accuracy of the colorimetric method for the determination of dissolved oxygen and the method for the removal of several interfering substances. (*ibid.*, **10** (1940) 163). VII. On the applicability of the new method to the determination of oxygen in trade waste, sea water, or in fish pond-water. (*ibid.*, **11** (1941) 39). VIII. A micro-colorimetric method for the determination of dissolved oxygen. (*ibid.*, **11** (1941) 48).

1) American public health association: Standard methods for the examination of water and sewage (1936).　2) 三宅，松居：水の化学分析法 (昭和 18 年).

定量には第 1 図に示すような簡単な装置を用いた。A は直径 3 cm 高さ 13 cm の大型試験管，B は 2 cc 注射器（実験室では 2 cc ピュレットを使用した方がよい），G はゴム栓でつくつた台，N はソーダライムを充した管，D はガラス製散氣板，S はスプレーである。但しガラス散氣板の代りに富士絹布片を二枚にして糸にてガラス管に結締したもので充分に満足な結果が得られる。

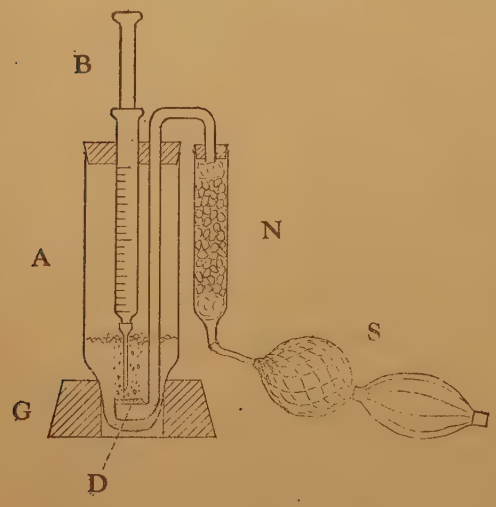


Fig. 1. Apparatus for titration while being aerated.
A: aeration vessel. B: burette of syringe type. D: air diffuser. G: support made of gummy stopper. N: soda-lime tube. S: compressor.

試　薬　1) 硬度の標準液：0.2615g $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ を蒸溜水に溶解し 500 cc に充す。独乙硬度 12° に相当する。　2) 石鹸液：20g 薬用石鹸（Sapo medicatus）を 56 %アルコールに溶解し 1 立としたものを原液とする。この原液で標準液 10 cc を滴定し，その値より稀釈度を定め，56 % アルコールで稀釈する。概ね原液の 4.5 倍のアルコールを混和すればよい。再びこの稀釈した石鹸液にて標準液を滴定し，丁度 4.50 cc が 12° に相当するように調整する。

定量法　10 cc の供試水を A にとり，液面より上方 2 cm の高さのところにマークをつける。先ずスプレーにより散氣して液中の CO_2 を除き，次に散氣しつゝ B より少量ずゝ石鹸液を加える。泡沫の上昇の模様を観察しながら，前記のマーク迄上昇してからは僅かづゝ石鹸液を加え，時々送氣を中止して泡沫の持続時間をみる。一分間泡沫が液面を全部覆つた時を終点とする。マグネシウムが多い時は更に石鹸液を過剰に加えて滴定終点に変化がないかを確認する必要がある。また滴定値が 3 cc 以上の場合には硬度値が低くでるので，二倍に蒸溜水で稀釈して再び滴定値を求むべきである。

他方，10 cc 蒸溜水を同様に滴定して盲験値を求め，供試水の滴定値から盲験値を減じた値に 2.5 を乗ずれば，独乙硬度が得られる。

3. 微量法の吟味　標準 $BaCl_2$ 溶液を用い，マクロ法とミクロ法の比較を行つた結果は第 1 表の通りであり，ミクロ法の盲験値は大きいが，硬度の実測値はマクロ法の値とよく一致している。次に $CaSO_4$,, $CaCl_2$ 及び $MgSO_4$ の既知硬度溶液を用いて，ミクロ法により硬度を測定した結果は第 2 表の通りである。即ちカルシウム塩では硬度 8° 迄は実測値は理論値と 10 % の誤差の範囲で一致するが，それ以上では偏異が大きくなる。マグネシウム塩では 5° 以下の場合，実験値は常に理論値より大きく，供試水の 30 %に相当する 94 % アルコールを添加すると理論値に近くなるのが認められた。天然の水のようにカルシウム塩とマグネシウム塩の混在する場合に於けるミクロ法の精度を知る爲に，12° の硬度をもつ $CaSO_4$ 及び $MgSO_4$ の等量混合液を種々に稀釈した供試水につきミクロ法により定量してみると第 3 表に示したように，5° 以下では実測値はやはり理論値より稍々大なる値を示した。しかして湖水では鹹湖を除いて一般にマグネシウムはカルシウムの 1/2 以下であり[3]，河川では平均 1/6 程度[4] であるから，硬度値を著るしく過大にする懸念も少い。從てマグネシウム塩の場合のようにアルコールを加えて，硬度値の過大を防ぐ必要もないと思われる。

4. 陸水の硬度測定結果　養鱒場の用水及び井水について，アルカリ度，カルシウム，マグネシウ

TABLE I. *A comparison of values for hardness obtained by the micro method* and the macro method.*

Hardness of $BaCl_2$ solns.	Titer** by macro method	Hardness found	Titer# by micro method	Hardness found
	cc.		cc.	
0	0.96		0.20	
1	5.16	1.04	0.65	1.12
3	12.6	2.89	1.38	2.95
5	20.9	4.98	2.19	4.97
8	33.2	8.05	3.46	8.15
10	43.2	10.5	4.12	9.30
12	45.0	11.0	4.63	11.1

* A glass filter was used as the air diffuser. ** Average of two determinations. # Average of four determinations.

TABLE II. *Hardness of calcium and magnesium salt solutions obtained by the micro method.*

Hardness of std. Ca or Mg solns.	$CaSO_4$*		$CaCl_2$**		$MgSO_4$#			
	Titer	Hardness found	Titer	Hardness found	Titer	Hardness found	Titer †	Hardness found
	cc.		cc.		cc.		cc.	
0			0.18					
1	0.66	1.15	0.56	0.90	0.80	1.50	0.59	0.97
3	1.40	3.00	1.38	2.96	1.60	3.50	1.48	3.20
5	2.24	5.10	2.13	4.84	2.30	5.25	2.14	4.85
8	3.34	7.85	3.30	7.75	3.30	7.75	3.25	7.64
10	3.94	9.36	3.90	9.25	3.98	9.46	3.88	9.20
12	4.72	11.3	4.36	10.4	4.50	10.8	4.70	11.2

* $CaSO_4$ solution: 0.294 *g* $CaSO_4$ per litre. A diffuser made of silk cloth was used. ** Standard $CaCl_2$ solution: 0.2140 *g* $CaCO_3$ was dissolved in dilute HCl, neutralized with ammonia and filled up to 1 litre. A diffuser made of silk cloth was used. # Standard $MgSO_4$ solution: 0.5280 *g* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ per litre. A glass diffuser was used. † Three *cc* of 94 % alcohol were added to 10 *cc* sample water.

ムを定量して，一時硬度及び全硬度を算出した結果と之等の供試水の硬度をミクロ法で定量した結果とを対比した。その結果は第 4 表に示す通りであつて，千歳孵化場用水の場合の偏差 29 % を除いては最大 15 %，平均 8.0 %の誤差の範囲で一致している。前記の定量法の吟味からも明かなように，滴定終点の鮮明度から推定すると，石鹸法としては特に硬度が低い場合には 10 % 迄の誤差は許容し得るのではないかと考えられる。

5. 摘　　要　（1）供試水 5～10 *cc* にて硬度の定量ができるように石鹸法の少量化を試み，振盪法の代りに通氣法を採用することにより野外の測定法としては滿足な結果を與える一微量法を決定した。（2）標準 $BaCl_2$ 溶液については ミクロ法はマクロ法とよく一致した。$CaSO_4$ 及び $CaCl_2$ 溶液については，硬度値 8° 迄は滴定値と正比例する。$MgSO_4$ 溶液では硬度 5° 以下の場合著るしく

3) 右村：湖沼学 (1937). 4) CLARKE, F. W.: Data of Geochemistry (1924).

* 研究の都合上，Ca, Mg の定量後約半年を經過したものを使用した。

TABLE III. *Hardness of a mixed solution of calcium and magnesium salts in an equal proportion.*

Hardness	Titer* cc.	Hardness found	Hardness	Titer* cc.	Hardness found
	0.73	1.32	8	3.53	7.82
2	9.03	2.22	9	3.79	8.98
3	1.51	3.28	10	4.20	10.0
4	1.93	4.32	11	4.68	11.2
5	2.31	5.26	12	5.05	12.1
6.5	2.98	6.95			

* Average of four determinations.

TABLE IV. *The hardness of several waters calculated from calcium and magnesium content and the hardness obtained by the micro method.*

Localities where water samples were collected.	Alkalinity*	Temporary hardness	CaO *mg/l*	MgO *mg/l*	Total hardness	Hardness found %	difference %
Oizumi hatchery	0.53	1.48	7.13	2.77	1.10	1.2	+9.1
Nikuchi hatchery							
used for hatching	0.265	0.74	8.26	2.87	1.23	1.3	+5.7
Used for raising	0.295	0.83	8.20	3.20	1.27	1.3	+2.4
Chitose hatchery	0.54	1.51	8.18	3.57	1.32	1.7	+28.8
Fuji hatchery	0.57	1.60	9.41	4.74	1.61	1.7	+5.6
Shiobara hatchery	0.61	1.71	12.8	4.56	1.85	1.7	−8.1
Sapporo hatchery	0.47	1.32	13.7	4.53	2.00	2.3	+15.0
Ogaki exp. station							
used for hatching	0.90	2.52	16.1	5.06	2.32	2.1	−9.5
used for raising	0.91	2.55	15.6	5.01	2.27	2.2	−3.1
Egawa hatchery	0.57	1.60	15.5	6.40	2.45	2.7	+10.2
Aisaka hatchery							
used for hatching	0.66	1.85	14.7	7.71	2.55	2.2	−13.7
used for raising	0.72	2.02	16.5	7.81	2.75	2.9	+5.5
Akesina hatchery							
used for hatching	0.77	2.16	20.7	7.40	3.11	2.8	−10.0
used for raising	1.07	3.00	28.9	9.25	4.19	3.7	−11.7
Samegai hatchery	1.84	5.15	47.5	6.22	5.62	5.2	−7.5
Well water at college of agric., Kyushu university	1.40	3.92	33.2	10.1	4.72	4.6	−2.5

* expressed in number of *cc* 0.1 n HCl per 100 *cc* sample water.

過大なる値を示すが，アルコールを添加するとこの誤差を除くことができた。（3）$CaSO_4$ と $MgSO_4$ との等硬度混合物については約 10％程度の過大値を與える。（4）養鱒用水及び井水について CaO 及び MgO の定量値から計算した全硬度に対しミクロ法の値を比較すると，平均偏差 8.0％の誤差の範囲で一致した。

水の微量分析法に關する研究
第10報　塩素イオンの比濁定量法

Studies on Micro-chemical Methods for Water Analysis
X. A nephelometric determination of chloride in water

富山哲夫・細川榮三郎
T. TOMIYAMA and E. HOSOKAWA

（九州大学農学部水產学教室）

The following procedure has been examined for its accuracy and found to give a promising result. To one of two solutions containing 5 cc of 0.5 N nitric acid and 1 cc of 0.5 N silver nitrate, rapidly add with shaking 20 cc of the unknown solution containing chloride, to the other add 20 cc of a standard chloride solution. Allow the resulting silver chloride to stand at room temperature in a dark room for ten to fifteen minuets before comparing in the nephelometer. If the ratio of the chloride concentration in the unknown and the standard is not between 2 and 1/2, dilute either the unknown or the standard, and repeat the measurement. The procedure can be applied over a concentration range between 0.9 to 20 mg of Cl per litre, and yields an accuracy of approximately 2.3 %.

It has been shown that by using Kleinmann's nephelometer almost no difference has been obtained between the accuracies of Kolthoff-Yutzy's and the present procedures (Table I and II). Furthermore, the accuracy of the present procedure which has been obtained by using Tomiyama's portable colorimeter as a nephelometer has been found to be comparable to that obtained by using Kleinmann's nephelometer (Table III).

塩素イオンの定量は容量法によると精密ではあるが，天然の淡水のように含量が 10 *mg/l* 以下の場合には，滴定終点が不鮮明であつて甚しい誤差を示す[1]。之に反し比濁法によると微量の塩素イオンの場合にも供試水を濃縮することなく定量できるので，微量定量法として多数の研究が発表されている。

比濁定量には二つの方法がある。一つは古く 1904 年に RICHARDS, WELLS 両氏[2] により報告されたもの，他は LAMB, CARLETON, MELDRUM 三 氏[3] による方法である。しかし KLEINMANN 氏[4] は多数の実驗結果より塩化水銀の粒子は比濁に対し不適当であると結論している。また供試液に硝酸銀を加える速度が塩化銀粒子の濃度に影響する事に関しては KOBER[5]，KLEINMANN[4] SCOTT and MOILLIET[6] 氏等により研究されている。そこで KOLTHOFF, YUTZY 両氏[7] は LAMB 法の定量操作を再吟味して精度を確立する目的で，アルコール，硝酸銀，硝酸の濃度，振盪，加熱，放置時間等の條件，異種塩類の影響について詳細な檢討を行い，0.8～42 *mg/l* の範囲では 2%以下の誤差を以て定量できる操作を決定した。他方，島田，木俣両氏[8] は前記のような種々の定量條件を考慮しないで，0.23～0.57 *mg/l* の範囲では最大誤差 10 %程度で定量し得る簡單な操作を報告している。

著者等は先ず KLEINMANN の比濁計を使用し，KOLTHOFF and YUTZY 法に対し硝酸と硝酸銀のみを用うる簡易法を比較研究したところ，前者は定量操作の嚴密なのに関らず，後者に比して著るしく精密とは認め難い結果を得た。依て携帶用比濁計を用いて簡易法を吟味し，0.3～20 *mg/l* の範囲に適用し平均誤差 2.3 %程度で定量しえられることを明かにした。

定　量　法

A. 試　　藥　（1）標準液：0.1649 *g* の純塩化ナトリウム或は 0.2103 *g* の純塩化カリウムを

（昭和 24 年 8 月 1 日受理）

水に溶解して 100 cc に充したものを原液とし，この 10 cc を 1 *l* に稀釈して標準液とする。この濃度は 10 *mg/l* である。之を更に稀釈して 5 *mg/l* のものも用意する。（2）0.5 *N* 硝酸： 37 cc の濃硝酸（sp. gr 1.38）を 1 *l* に稀釈する。（3）0.5 *N* 硝酸銀：8.50 *g* $AgNO_3$ を溶解し 100 cc に充す。

B. 比濁裝置　塩化銀は太陽光線に対して鋭敏であるから，電燈を光源として比濁する。本研究には 100 W の晝色光ランプを比濁計より 1.5 m の距離におき，比濁計との間は第 1 図のような暗箱 D を木或は厚紙にてつくり，内面を黒色として，能う限り平行光線を比濁計に照射する。比濁計は第 3 報[1] に記載した比色計の脚部を取離し，底部に黒色紙或はエボナイト板をおき，比色計の蓋は開放してこの部に光源 L よりの平行光線を照射する。比濁管としては，比色管をそのまゝ使用できるが，比色内管 a の内部には黒色紙を円筒にして内挿し，比色外管 A の側面だけから光線が入るようにする。注意すべきことは，比色管の目盛が側面からの光線を反射して 10～20%の誤差を起すことである。依て目盛につけた白色塗料を除去し，また枝管を有する比色管は枝管の部 A を光源の方向に向けて光線が目盛の部に照射しないようにして比濁せねばならない

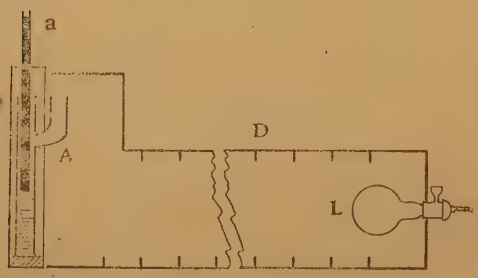


Fig. 1. Nephelometer tubes and a source of light.
A: nephelometer cup with side tube. a: inner tube, inside of which is coated with a black paper. D: dark chamber. L: electric lamp (100 W).

C. 比濁法　二箇のミクロビーカーにそれぞれ 5 cc 0.5 *N* 硝酸及び 1 cc 0.5 *N* 硝酸銀を加えて混和し，次に 20 cc 供試水或は 20 cc 標準液をそれぞれ混和し，10～15 分間放置する。然る後に濁度の大きい方を振盪して枝付比濁管に移し，濁度の小なる方を振盪して他管に移す。次に比濁内管を挿入し，濁度の小なる方の比濁内管を適当の明るさに固定し，枝管を有する比濁管の内管を上下して同じ明るさの点を決定する。この場合少くとも 10 回観測の比濁計讀みの平均値を求める。供試水の Cl′ 濃度は次式によりえられる。

$$x = St \times \frac{H}{h}$$

こゝに，x =供試水の Cl′ mg/l, St = 使用した標準液の Cl′ mg/l, H = 標準液を充した比濁管の読み，h =供試水を充した比濁管の読み。

尙，定量した後には比濁管を充分に洗滌しないと，器壁に微粒子が附着するので，次の定量に誤差を招く。また供試水の Cl′ 濃度が 20 mg/l 以上の場合には，蒸溜水で適宜に稀釈して比濁せねばならない。定量の精度を高めるには，標準液の Cl′ 濃度は供試水のそれの 1/2～2 倍の範囲にあることを要する。

実驗結果及び考察

1, KOLTHOFF-YUTZY 法と本法との比較

1,5 m の距離においた 100 W 電球の光源と KLEINMANN 比濁計とを用いて，種々の既知濃度の塩化ナトリウム溶液を KOLTHOFF-YUTZY 法並に本法によつて比濁し，第 1 表並に第 2 表のような結果がえられた。

第 1 表に示した KOLTHOFF-YUTZY 法による結果を見ると，比濁した両液の濃度比が 1：2 であれば，0.6～40 *mg/l* の範囲では平均誤差約 2.7%，最大誤差 5.6%，比濁計読みの変異 2.0%であつた。しかし濃度比が 1:3 となれば誤差が大きくなり，また 1.25 *mg/l* 以下或は 40 *mg/l* 以上である

TABLE I. *The accuracy of* KOLTHOFF *and* YUTZY *method*

Standard solution		Sample solution				
Cl *mg/l*	Setting of nephelometer scale	Average of ten settings of the scale	Mean deviation of readings %	Cl found *mg/l*	Cl theor. *mg/l*	Error %
20.0	10	26.7	2.1	7.94	7.50	−0.1
10.0	20	40.6	2.4	4.93	5.00	−1.4
20.0	25	16.5	2.5	30.1	30.0	+0.3
20.0	25	10.5	2.8	48.0	60.0	−20
20.0	30	15.2	1.0	39.5	40.0	−1.3
10.0	40	20.4	1.2	19.6	20.0	−2.0
5.00	40	19.4	1.5	10.3	10.0	+3.0
2.50	40	19.3	3.8	5.18	5.00	+3.6
1.25	40	21.0	2.1	2.38	2.50	−4.8
1.25	40	9.39	4.1	5.33	5.00	+6.6
0.625	40	21.2	1.6	1.18	1.25	−5.6
0.625	40	10.4	3.2	2.40	2.50	−4.0

TABLE II. *The accuracy of the present procedure in using* KLEINMANN'S *nephelometer*

Standard solution		Sample solution				
Cl *mg/l*	Setting of nephelometer scale	Average of ten settings of the scale	Mean deviation of readings %	Cl found *mg/l*	Cl theor. *mg/l*	Error %
10.0	10	18.9	1.4	5.29	5.00	+5.8
5.00	10	20.8	1.2	2.40	2.50	−4.0
5.00	10	39.0	1.1	1.28	1.25	+2.4
1.25	20	40.0	1.4	0.625	0.625	0.0
10.0	40	18.4	2.4	21.7	20.0	+8.5
10.0	40	18.9	2.1	21.3	40.0	−47
5.00	40	20.0	2.8	10.0	10.0	0.0
2.50	40	9.97	1.6	10.0	10.0	0.0
2.50	40	19.3	0.9	5.18	5.00	+3.6
1.25	40	10.0	3.2	5.00	5.00	0.0
1.25	40	19.8	2.5	2.55	2.50	+2.0
0.300	40	10.1	2.9	1.19	1.25	−4.8

と誤差が著るしく増加した。他方，第 2 表に示した本法による結果では，比濁した両液の濃度比が 1 : 2～1 : 3 の範囲であれば，0.3～20 *mg/l* の範囲では平均誤差 2.6 %，最大誤差 8.5 %，比濁計読みの変異 1.9 %であつた。但し 20 *mg/l* 以上では，AgCl が速に凝固するために誤差が大きく，例えば 40 *mg/l* では 47 %の誤差を生じた。

之等二つの方法を比較対照すると，精度に於ては殆ど大同小異であるが，操作の点では本法の方がア

ルコールを使用しない点で優つている。しかしKOLTHOFF氏等の方法では 40 *mg/l* 迄は測定に困難はないが，本法では 20 *mg/l* 以上になると AgCl が凝固する欠点がある。KOLTHOFF 氏等はAgClが過剰の銀イオンを吸着して正の電荷をもつために，SO_4'' のような多価のアニオンの存在に鋭敏であることを指摘しているので，SO_4'' の多い天然水の場合には，KOLTHOFF 法よりも凝固しやすい欠点をもつ本法を適用することには注意が必要である。

2. 携帯比濁計を用いた場合の本法の精度

KLEINMANN 比濁計の代りに著者（富山）の携帯比色計を定量法の項に記載した方法で比濁計に変改したものを用いて，著者等の方法の精度について吟味した。その結果は第 3 表に示した通りである。

TABLE III. *The accuracy of the present procedure in using* TOMIYAMA'S *portable colorimeter.*

Standard solution	Sample solution					
Cl *mg/l*	Setting of nephelometer scale	Average of ten settings of the scale	Mean deviation of readings %	Cl found *mg/l*	Cl theor. *mg/l*	Error %
10.0	50	16.9	4.4	29.6*	30.00	−1.3
10.0	〃	24.9	3.3	20.1	20.00	+0.5
10.0	〃	31.4	2.9	15.9	15.00	+6.0
5.00	〃	12.6	5.6	19.9	20.00	−0.5
5.00	〃	16.2	3.6	15.4	15.00	+2.7
5.00	〃	24.9	3.3	10.05	10.00	+0.5
5.00	〃	32.0	3.9	7.82	7.5000	+4.3
2.50	〃	13.1	5.4	9.54	10.00	−4.6
2.50	〃	16.1	3.4	7.77	7.500	+3.6
2.50	〃	24.6	3.5	5.08	5.000	+1.6
2.50	〃	32.8	2.6	3.81	3.750	+1.6
1.25	〃	12.9	5.6	4.84	5.000	−3.2
1.25	〃	17.3	4.5	3.61	3.750	−3.7
1.25	〃	24.9	3.3	2.51	2.500	+0.4
1.25	〃	32.1	2.8	1.95	1.875	+4.0
0.625	〃	17.4	4.8	1.80	1.875	−4.0
0.625	〃	24.8	3.8	1.254	1.250	+0.3
0.625	〃	32.2	3.2	0.970	0.9375	+3.5
0.3125	〃	17.5	4.6	0.893	0.9375	−4.8

* The nephelometric comparison was made within five min. after mixing the sample solution with the reagent.

この結果によると，0.3 *mg/l* より 30 *mg/l* 迄の濃度で，濃度比が 1：4 迄の範囲では，平均誤差は 2.7％，最大誤差は 6.0％，比濁計読みの変異は 3.9％であり，また濃度比が 1：2 迄の範囲では，平均誤差 2.3％，最大誤差 3.9％，読みの変異 3.3％であつた。KLEINMANN 比濁計を使用した場合と比較すると，平均誤差の点では殆ど遜色は認められないが，比濁計の読みの変異は二倍近くに達する。これは副尺のない本比濁計では避けえられない点であるから，本装置を用いる時には測定回数を 10 回位として読みの変異を少くすることが望ましい。また 20 *mg/l* 以上では 5 分間以内に AgCl の混

濁が凝固するので，この濃度以上では稀釈して比濁すべきである。

総　　括

1. KOLTHOFF-YUTZY 法のアルコール使用を省いた比濁操作を，次に示す実驗的根拠から簡易法として提唱する。

2. KLEINMANN 比濁計を使用して，KOLTHOFF-YUTZY 法と著者等の方法とを精度について吟味比較したところ，両者に殆ど差異が認められなかつた。

3. 著者（富山）の携帯比色計を比濁計として用い，著者等の方法の精度を吟味した結果は，KLEINMANN 比濁計を用いた場合に比し，優劣は殆ど見られなかつた。

4. 本定量法は塩素イオン濃度 0.3～20 *mg/l* の範囲に適用しえられる。比濁すべき両液の濃度比が 1：2～1：1/2 の場合には平均誤差 2.3％，最大誤差 3.9％ を示した。

文　　献

(1) WINKLER, L. W.: Z. anal. Chem., **53**, 359 (1914). KOLTHOFF, I. M.: ibid., **56**, 498 (1917). 三宅泰雄：氣象集誌，第 2 輯，第 14 卷，177 (1936).

(2) RICHARDS, T. W., and WELLS, P. V.: Amer. Chem. J., **31**, 235 (1904).

(3) LAMB, A. B., CARLETON, P. W., and MELDRUM, W. B.: J. Amer. Chem. Soc., **42**, 251 (1920).

(4) KOBER, P. A.: J. Ind. Eng. Chem., **10**, 556 (1918).

(5) KLEINMANN, H.: Biochem. Z., **99**, 141 (1919).

(6) SCOTT, A. F., and MOILLIET, G. L.: J. Amer. Chem. Soc., **54**, 205 (1932).

(7) KOLTHOFF, I. M., and YUTZY, H.: *ibid.*, **55**, 1915 (1933).

(8) 島田，木俣：日水学.，**1**，5 (1932).

(9) 富山，渡辺：農化.，**14**，187 (1938).

水の微量分析法に關する研究
第11報 硫酸塩の比濁定量法

Studies on Micro-chemical Methods for Water Analysis

XI A nephelometric method for the determination of sulfate.

富山哲夫・細川榮三郎

T. TOMIYAMA and E. HOSOKAWA

A procedure for the nephelometric determination of sulfates has been given in which to a 20-cc sample solution is added 0.5*g* of a powdered reagent which has newly been adopted in the present method. The reagent is a powdered mixture of 10*g* of barium chloride, 10*g* of tartaric acid, and 80*g* of sodium chloride. The nephelometlic comparison can safely be made by diffused light in the laboratory without using a particular artificial source of light.

The method can be applied to the determination of from 1.9 to 480*mg* SO_4 per litre. Data are presented showing that the possible accuracy of this method is at least as good as in SHEEN'S method (TABLE I and III). The mean error was about 2.4%, the maximum error about 5.6% (TABLE III).

硫酸塩の比濁定量法については多数の研究がある。生化学或は薬学方面に於ては KOLTHOFF, DENIS, LORBER, 青山氏等の研究があり，いずれも標準液と比濁する方法である。[1] 他方，水質特にボイラー用水の硫酸塩定量についても多数の研究がある。それらの大部分は電球の赤熱線條が $BaSO_4$ の混濁により透視できなくなる時の液層を求め，これを予め標準 SO_4'' 溶液によつて補正して SO_4'' に換算する方法である。この方法に於ける塩化バリウムの加えかたについて[2] また他の塩類，温度，酸度の影響について[3] 多数の研究が既に報告されている。之等の研究の内で，SHEEN, KAH LES, ROSS 三氏[4] 及び三宅[5] 氏は水の分析法として比較的詳細に檢討している。SHEEN 氏等は特別に考案した比濁計を用いた定量法を吟味したものであり，三宅氏は保護膠質を含む試薬を用いて比濁法を檢討している。

しかし野外に於ける迅速定量法としては，SHEEN 氏等の如く電燈を光源とする比濁計は使用し難いし，また三宅氏の方法では $BaSO_4$ 微粒子の保護膠質の試薬調製が多少複雜であり，しかもその注意の割合に測定範囲が狹い。依て著者等は先ず SHEEN 法を著者（富山）の携帶比色比濁計[6] を用いて，どの程度の精度が得られるかを吟味し，次に試薬類の簡略を目的として固形試薬の適用を試みたところ，滿足な結果を收めたので，以下報告する次第である。

比濁定量法

A. 試　薬　1) 標準硫酸カリウム溶液：0.9099*g* K_2SO_4 を溶解し 1*l* に充す。この液は 500*mg* SO_4/l に相当するので，之より供試水の SO_4 含量に近い標準液をつくる。淡水の場合には 5 或は 10*mg*/*l* の標準液が適している。　2) 粉末混合試薬：塩化バリウム，酒石酸，食塩の粉末をそれぞれ 1：1：8 の比に混合し，乳鉢で細碎する。

B. 定量法　標準液及び供試水 20*cc* にそれぞれ粉末混合試薬を約 0.5*g* 加え，1 分間よく振盪溶解し，15～20 分間放置する。然るのち濁度の小さい方を枝管なしの比濁管に移し，內管を適当の明るさの点に固定する。濁度の大きい方は枝管つきの比濁管に移し，その日盛が側面に向くように比濁管を廻轉し，內管をさげて他の比濁管と比較し，同一明るさの点を求める。光源には特別に電球を用うる必要なく室內の散光で差支えない。勿論第 10 報に示したように，比濁管の底面には黑色板をおき，また比濁內管には黑色紙を挿入して使用する。供試水の SO_4'' 含量は次式によつて計算する。

$$x\ (mg/l) = St \times \frac{H}{h}$$

但し St は標準液の SO_4'' mg/l, H は標準液をいれた比濁管の読み, h は供試水をいれた比濁管の読み。

定量法の吟味

1. 携帯比濁計による SHEEN 法の吟味

硫酸カリウムの標準液を稀釈して 1.88～360mg SO_4/l の範囲の溶液をつくり，この 20cc に 10cc の Salt-acid mixture を加え，次に塩化バリウム粉末（20～30 メッシュ）を 0.1g 加えてのち 1 分間強く振盪し，10～15 分間放置してから携帯比濁計により比濁した。なお光源には前報[6]の塩素イオンの比濁定量に使用したものと同様のものを用い，暗室内で比濁測定を行つた。その結果は第 1 表に示すようである。

TABLE I, *The accuracy of* SEEN *et al's method using* TOMIYAMA'S *portable nephelometer.*

Standard Solution		Sample solution				
SO_4 mg/l	Setting of nephelometer scale	Average of the settings of the scale	Mean deviation of readings %	SO_4 found mg/l	SO_4 theor. mg/l	Error %
1.875	50	25.6	4.0	3.66	3.75	−2.4
	〃	16.8	4.1	5.58	5.62$_5$	−0.8
	〃	13.0	6.4	7.22	7.50	−3.9
3.75	50	25.0	2.4	7.50	7.50	0.0
	〃	17.0	2.4	11.0	11.2$_5$	−2.1
	〃	12.9	5.8	14.5	15.0	−3.2
7.50	50	24.6	2.9	15.1	15.0	+0.6
	〃	16.5	3.0	22.7	22.5	+1.0
	〃	13.4	3.8	28.0	30.0	−6.7
15.0	50	25.5	3.6	29.4	30.0	−2.0
	〃	16.7	3.4	44.9	45.0	−0.2
	〃	13.1	4.0	57.3	60.0	−4.6
30.0	50	24.6	2.4	61.0	60.0	+1.6
	〃	17.0	2.4	88.3	90.0	−2.0
	〃	12.9	4.3	116	120	−3.2
60.0	50	25.7	2.2	117	120	−2.6
	〃	16.5	3.0	182	180	+1.0
	〃	12.9	2.9	233	240	−3.1
120.0	50	23.5	2.8	256	240	+6.4
	〃	15.8	3.8	380	360	+5.4

この結果をみると，3.8～360 mg/l の濃度範囲に亘り比濁すべき両液の濃度比が 1：2～1：4 の範囲では，平均誤差 2.7%，最大誤差 7.2%，比濁計の 10 回読みの変異は 3.5% であつた。誤差は濃度比によりかなり変化し，平均誤差及び比濁計読みの変異は濃度比 1：2 ではそれぞれ 2.2% 及び 2.9%，1：3 では 1.8% 及び 3.1%，1：4 では 4.1% 及び 4.4% であつた。従て比濁の精度を高めるには，濃度比が 1：1 に近い條件を採用すべきである。なお第 1 表の結果からは，簡単な携帯比濁計を使用しても SHEEN 氏等の比濁計による値に劣らない結果の得られることが明かとなつた。但し比濁観測自身の変異は平均 3.5% であるから，視野に目を慣らすこと，読みの回数を多くすることは定量の精度をよくする爲には絶対に必要である。

2. 携帯比濁計と固形試薬とを用うる本定量法の吟味

SHEEN 氏等の Salt-acid mixture を加える目的は，供試液の反應を酸性として燐酸バリウムの沈澱するのを防ぎ，またこの試薬中の食塩は SO_4 の定量的沈澱を妨害する他種のイオンの影響を除くにあることは DENIS, REED 両氏の研究[7] から明かである。両氏によると燐酸バリウムの混在しない $BaSO_4$ の析出には pH 3.0～3.8 を最適としている。依て著者等は野外での分析の場合を考慮し，試薬をみな固形とするために，塩化バリウム，食塩の外に酒石酸を定量法の項に記載した割合に混合したものを試み

TABLE II, *A test for the amount of the powdered reagent to be added.*

SO_4 in standard solutions *mg/l*	0.1*g* of the reagent added. Scales set	0.2*g* of the reagent added average of four readings	0.5*g* of the reagent added average of five readings
30	50	49.0	50.2
60	40	39.0	39.0
120	30	29.2	30.0
240	20	18.8	19.0
480	20	18.7	18.5

TABLE III, *The accuracy of the present method.*

Standard solution		Sample solution				
SO_4 *mg/l*	Setting of nephelometer scale	Average of the settings of the scale	Mean deviation of readings %	SO_4 found *mg/l*	SO_4 theor. *mg/l*	Error %
1.875	50	24.1	3.1	3.89	3.75	+3.6
	〃	16.5	3.6	5.69	5.62_5	+1.0
	〃	13.2	4.4	7.11	7.50	−5.3
3.75	50	24.7	2.5	7.60	7.50	+1.3
	〃	16.2	4.0	11.6	11.25	+2.9
	〃	12.2	5.6	15.4	15.0	+2.5
7.50	50	24.2	2.4	15.5	15.0	+3.2
	〃	16.4	3.2	22.9	22.5	+1.6
	〃	12.3	4.6	30.5	30.0	+1.6
15.0	50	24.5	2.5	30.6	30.0	+2.0
	〃	15.8	3.1	47.5	45.0	+5.5
	〃	12.6	3.8	59.6	60.0	−0.8
30.0	50	24.7	2.8	60.8	60.0	+1.2
	〃	16.5	3.0	91.0	90.0	+1.0
	〃	13.0	3.1	116	120	−3.8
60.0	50	24.5	2.0	123	120	+2.0
	〃	16.3	4.3	184	180	+2.2
	〃	12.5	4.7	240	240	0.0
120.0	50	24.1	3.0	249	240	+3.7
	〃	16.4	2.9	366	360	+1.6
	〃	12.9	4.2	465	480	−3.2

たところ，次に示すように良好な結果が得られた。

先ず硫酸カリウムの種々な濃度の液 20cc に粉末混合試薬を 0.1g 加えた場合と，0.3g 或は 0.5g 加えた場合につき濁度の変化をみたところ，第2表に見られるように殆ど差異が認められなかつた。従て次に 1.8～480mg SO_4/l の範囲の液について，室内の散光下に於ける比濁定量の精度を吟味した。その結果は第3表に示す通りであつて，平均誤差 2.4%，最大誤差 5.6%，比濁計読みの変異は 3.5% であつた。SHEEN 法の場合と同様に，誤差の大さは濃度比によりかなり変化し，平均誤差及び読みの変異は濃度比 1：2 ではそれぞれ 2.4% 及び 2.6%，1：3 では 2.3% 及び 3.4%，1：4 では 2.5% 及び 4.4% であつた。従て定量に当つては成るべく供試液の濃度に近い標準液を選ぶことが望ましい。第3表の結果を第1表の SHEEN 氏の方法によつて得た値と比較すると，平均誤差に於てもまた比濁計の読みの変異に於ても，殆ど差異は認められない。

総　括

（1） 携帯比濁計を用いて SHEEN, KAHLER 及び ROSS 氏等の方法を吟味したところ，平均誤差 2.7% であつて，簡単な比濁計を用いても充分な精度が得られることが確かめられた。

（2） 粉末の塩化バリウム，食塩及び酒石酸より成る新しい SO_4 沈澱試薬を試みて良結果を得た。この試薬と携帯比濁計とを用いて簡単な比濁操作で定量する方法を決定し，その精度を吟味した結果は 1.9～480mg SO_4/l の範囲では平均誤差 2.4% であつて，SHEEN 氏等の方法に劣らなかつた。

（3） 供試水の濃度は標準液の濃度の 1/4～4 倍迄は定量できるが，精度が低下するので 1/2～2 倍の範囲が望ましい。

文　献

(1) KOLTHOFF, I.: Pharm. Weekblad, **54**, 1005 (1917)
DENIS, W.: J. Biol. Chem., **49**, 311 (1921). DENIS and REED: *ibid.*, **71**, 205 (1926).
COLLINS, W., and FOSTER, M.: J. Ind. Eng. Chem., **15**, 1078 (1923).
LORBER, L.: Biochem. Z., **163**, 476 (1925).
青山，醍醐：薬学雑，**48**, 702 (1928).

(2) JACKSON, D.: J. Amer. Chem. Soc., **23**, 799 (1901).
MUER, H.: J. Ind. Eng. Chem., **3**, 553 (1911).
MCBRIDE, R., and WEAVER, R.: *ibid.*, **5**, 469 (1913).
HIBBARD, P.: *ibid.*, **16**, 804 (1924).
TOEPPER, E., and BOUTWELL, P.: *ibid.*, Anal. Ed., **2**, 118 (1930).

(3) HINDS, J.: J. Amer. Chem. Soc., **22**, 269 (1900).
PARR, S, W., and MCCLURE, C. H.: *ibid.*, 26, 1139 (1904).
JACKSON, D.: *l. c.* MUER, H.: *l. c.* MCBRIDE, R., and WEAVER, R.: *l. c.* TOPPER, E., and BOUTWELL, P.: *l. c.* PARR, S. W, and STALEY, W. D.: J. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **3**, 66 (1931).

(4) SHEEN, R. T., KAHLER, H. L., and ROSS, E. M.: J. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **7**, 262 (1973).

(5) 三宅泰雄：氣象集誌，第2輯，第14巻，585 (1936).

(6) 富山，細川：日本水産学会誌に印刷中.

(7) YOE: "Photometric chemical analysis". Vol. II Nephelometry (1929).

水の微量分析法に關する研究
第12報　カルシウムの比濁定量法

Studies on Micro-chemical Methods for Water Analysis
XII. A nephelometric method for the determination of calcium.

富山哲夫・細川栄三郎
T. TOMIYAMA and E. HOSOKAWA

（九州大学農学部水產化学教室）

In the present work a procedure has been developed in which 0.3～0.4 g powdered ammonium oxalate was added to 20-cc sample water, dissolved by shaking for several minutes and further shaking several times while allowing to stand at room temperature for 10～15 minutes before comparing in the nephelometer.

Experiments have been carried out to see the accuracy of the method. Various factors affecting the results of the nephelometric determination have been studied. Within a range between 0.4 to 50 mg Ca per litre, the mean error involved in the method approximated 3.4 %, the maximum error being about 8.5 % (Table I). The presence of magnesium in as much concentration as that of calcium did not increase the turbidity provided that calcium be present above 6 mg/l (Table III). The quantitative precipitation of calcium oxalate was obtained when pH value of a sample water was above 1.5 (Table II). Nearly no effect on the determination has been noted of the presence of common soluble constituents of natural fresh waters (Table IV).

カルシウム（以下 Ca と記す）の微量定量法としては，一般に先ず蓚酸カルシウムとして分離し，次に結合した蓚酸を $KMnO_4$ によつて定量し，之より Ca 量に換算する方法が採用されている[1]。この方法は比較的簡單ではあるが，淡水の Ca 全量は大約 3～15 *mg/l.* の範囲のものが大部分であるから，予め濃縮しないと誤差が大きくなる。よつて著者等は 10～20 *cc* 程度の供試水で予め濃縮することなしに定量する目的から，比濁定量法について種々檢討を行つた。

Ca の比濁定量法は一般には使用されていないが，現在迄には二三の研究がある。JAPHE[2] は Ca の比濁定量の目的に蓚酸カルシウムの微粒子が使用できることを明かにし，一つの定量操作を報告している。GARMASH[3] は蓚酸アンモンを用いる Ca の比濁滴定法について研究し，16 *mg/l* 程度のものが最適であること，定量には 5～20 分を要することを報告した。他方，POLINKOWAJA[4] は JAPHE の方法を追試し，該比濁法をつくる蓚酸カルシウム粒子が大形であつてしかも白色である爲に比濁には適当であるとし，また粒子はアンモニヤ及び過量の沈澱剤の存在により或は試藥の混和法によつてもその性質を著るしく変化し，JAPHE の操作によつては常に同一條件で沈澱をつくることは不可能であると指摘している。

著者等は供試水に同形蓚酸アンモンを加えて，急速に沈澱をつくる條件を採用し，この微粒子を著者（富山）の携帶比濁計により比濁することを試み，定量の精度 pH，マグネシウム塩等の影響について吟味し，迅速法として滿足すべき結果を得たので，以下に報告する次第である。

（昭和 24 年 8 月 1 日受理）

1) MILLER, R. P. and KIRK, P. L.: Mikrochemie, **14**, 15 (1933). 2) JAPHE: Sprechsaal, **58**, 807 (1925). 3) GARMASH, E. P.: Zadovskaya-Lab., **2**, Nr. 8, 13 (1933). Chem Abs., **28**, 5366 (1934). 4) POLINKOWAKAJA, A. I.: Transact. State Inst. for Testing Build Mat. and Glass, Nr. **27**, 11 (1929). Chem Abs., **25**, 3590 (1931).

定　量　法

A. 試　　薬　(1) 粉末蓚酸アンモニヤ：結晶を乳鉢にて充分に細粉としたもので，蒸溜水に加えて不溶物のないことを確かめる。(2) Ca 標準液：次項に記載する方法で調製した蓚酸カルシウムの 0.1823 *g* を約 200 *cc* の熱水に懸濁し，次に固体が溶解するまで稀塩酸を可及的少量加える。もし塩酸が過剰となつた場合には稀アンモニヤで沈澱が生じない程度に中和せねばならない。この溶液は冷却した後，500 *cc* に充して原液とする。この原液 25 *cc* を 250 *cc* に稀釈したものは 10 *mg* Ca/*l* であつて，之を標準液として使用する。(3) 蓚酸カルシウムの調製：約 2*g* の水酸化カルシウム或は 3*g* の炭酸カルシウムを約 500 *cc* の水に懸濁し，之に稀塩酸を少量ずつ加えて溶解し，次に約 5 *g* の蓚酸アンモニヤを少量の熱水にとかした液を混和し，更に少量の稀アンモニヤ水を加える時は多量の沈澱を生ずる。上澄液を傾斜した後，約 100 *cc* の熱水に懸濁し，稀塩酸を加えて溶解し，次で稀アンモニヤを加えて沈澱し，数回傾斜洗滌する。之を減圧濾過し，室温にて充分乾燥する。

B. 方　　法　供試水及び標準液の 20 *cc* を夫々ミクロビーカーに採り，両者に 0.3～0.4 *g* の粉末蓚酸アンモニヤを加え，数分間よく振盪溶解し，尚 10～15 分間時々振盪しつゝ放置する。かくして生じた濁度を携帯比濁計[5]を用いて比濁する。

比濁に当つては供試水及び標準液はよく混合した後，外観上濁度の少い方を枝管のない比色管に移し，比濁し易い明るさに内管を固定する。多くの場合目盛 50 程度がよい。次に濁度の多い方を枝管を有する比色管に移し，なお目盛の部分を管の側面に向ける様に枝管を 90° 廻しておく。これは前方からの光が目盛によつて遮られることを防ぐ爲である。

測定の光源には 100 W の晝色光ランプを比濁計より 1.5 *m* の距離におきレンズで平行光線として使用するのが最良であるが，磨硝子を透した実驗室内の分散光を光源としても差支えない。本研究では野外でも本法を実施する場合を考慮して特別の光源裝置を使用しないで，実驗室内に入る分散光線を光源として使用した。但しこの場合には左右の比濁管に同じ明るさの光をあてることが重要であるから，予め一定濁度のものを両比色管に移し，同一明るさを示すかを檢しておく必要がある。

実驗結果及び考察

1. 比濁の精度　0.1250 *g* の純炭酸カルシウムを少量の稀塩酸に溶解し過剰の塩酸はアンモニヤで中和した後 1 *l* に充した液（50 *mg* Ca/*l*）を調製し，之を順次稀釈して 1.5～50 *mg* Ca/*l* の範囲の供試液をつくり，之等を本定量法に從つて処理比濁し，本法の精度について吟味した。その結果は第 1 表に示すようである。

この結果によると，0.4～50 *mg*/*l* の範囲では理論値に対する実驗値の平均偏差は 3.4%，最大偏差は 8.5 %であつた。この誤差には個人誤差の占める割合が大きく，比濁の読みの平均偏異は 2.4 %に達するので，一般比濁法の注意に從い，比濁の視野に視力を慣らすこと及び少くとも 5 回以上の比濁計の読みの平均をとることが重要である。なお第 1 表の結果でみると，左右両比濁管の濁度の比が 1：4 程度の廣い範囲まで比濁計の読みと濁度とが比例し，1：2 の時の差均誤差は 2.9 % 比濁計の読みの変異は 2.1 %，1：4 の時のそれらの値はそれぞれ 3.4 %及び 2.6 %であつた。從て多数の標準液や蒸留水を携行することの困難な野外の研究では，既に比色法の場合に吟味した方法[6]を適用し，濃厚な標準液例えば 1000 *mg* Ca/*l* の 0.1～0.5 *cc* を精密に供試水に加えたものと，供試水のみのものとを同時に処理比濁し，次式により求めることも可能である。

$$\text{Ca } mg/l = Z \times \frac{h}{H - h}$$

但し Z：標準液を添加したために増加した Ca の濃度 *mg*/*l*. H：供試水のみを蓚酸アンモニヤにて

5) 富山・細川：日本水産学会誌に印刷中

TABLE I. *The accuracy of the method.*

Standard solution		Sample solution				
Ca *mg/l*	Setting of nephelometer scale	Average of five settings of scale	Mean deviation of readings %	Ca found *mg/l*	Ca theor. *mg/l*	Error %
0.3906	100	26.2	4.0	1.49	1.562	−4.6
0.7813	100	51.4	2.2	1.52	1.562	−2.7
0.7813	100	26.0	1.5	3.00	3.125	−4.0
1.5625	80	36.8	1.7	3.39	6.125	+8.5
1.5625	80	19.2	1.7	6.51	6.250	+4.2
3.125	80	40.6	1.8	6.16	6.250	−1.5
3.125	80	20.6	2.3	12.1	12.50	−3.0
6.250	50	25.6	1.9	12.2	12.50	−2.3
6.250	60	14.6	2.8	25.7	25.00	+2.8
12.50	50	25.6	1.9	24.4	25.00	−2.8
12.50	40	9.8	3.3	51.0	50.00	+2.0
25.00	40	19.2	3.3	52.1	50.00	+4.2

処理したものを枝管のない比色管に移し，適当の明るさ迄に内管を降下した時の内管底面の高さ，h：〔供試水＋標準液〕を同様処理して枝管付比色管に移し，内管を降下して他の比色管と同一明るさに達した時の内管底面の高さ（5 回以上測定の平均値）

なお本研究に於ては蓚酸アンモニヤを沈澱剤として使用したが，一部の実験では蓚酸カリウムをも併

TABLE II. *Influence of acidity upon the turbidity*

pH values of sample waters	Average of five nephelometric readings against the control fixed at 50				pH values observed after standing for 15 min.
	Reading*	Mean deviation	Reading**	Mean deviation	
2.2	49.0	1.20	49.6	0.48	4.9
1.5	49.8	0.32	50.2	1.44	4.5
1.3	52.8	0.96	49.8	1.36	3.7
1.1	66.6	0.72	57.8	1.76	8.5

* After allowing the mixture of sample water and ammonium oxalate to stand for 10～15 min.

** After allowing the mixture of sample water and ammonium oxalate to stand for 20～30 min.

6) 富山，渡辺：農化., **14**, 187 (昭, 13).

用したところ，生じた沈澱の粒子が蓚酸アンモニヤ使用の場合に比し大きいこと，また Ca 含量の少い液では比濁に適当な白濁を生じ難いことを観察した。

2. 比濁定量に対する酸度の影響　供試水の pH が約 4.5 以上の場合には蓚酸カルシウムの沈澱の生成は阻害されないが，強酸性の場合にはその生成が不完全なことは既知の事実である。從て塩酸々性の水が本比濁法に対して如何に影響するかを知る爲に，アルカリ度 1.1 の水道水に *N*-HCl を加えて 0.1～0.01 *N* としたものを供試水とし，HCl の代りに蒸溜水を加えた水道水を対照として比濁し，第 2 表に示すような結果を得た。即ち pH 1.5 以上の酸度では全く影響はないが，pH 1.5 以下ではかなり阻害される。但し蓚酸アンモニヤを加えて 20～30 分間放置する時は，pH 1.3 迄は誤差なく定量し得られる。これは塩酸々性液に試薬を加えると，$2HCl + (NH_4COO)_2 \rightarrow (COOH)_2 + 2NH_4Cl$ の反應によつて HCl が消失するためであつて，第 2 表に見られるように試薬添加後は pH 1.5 より 4.5 に上昇する現象から明かである。

3. 比濁定量に対するマグネシウム其他異成分の影響　マグネシウムを多量に含む海水中の Ca の容量分析には約 7% の誤差を生ずる，それ故に本比濁法に対するマグネシウムの影響について吟味を試みた。即ち比濁の精度につき実驗したと同様にして 100 *mg* Ca/*l* の液をつくり，他方 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ より調製した 100 *mg* Mg/*l* の液を前記 Ca 溶液に混合した液及び更に之を稀釈した溶液を本比濁法によつて処理し，第 3 表のような結果を得た。Ca 含量が 6 *mg*/*l* 以上では Mg の影響は殆ど認められ

TABLE III. *The effect of magnesium upon the nephelometric determination.*

$CaCl_2$ solution		The $CaCl_2$ solution containing magnesium				
Ca *mg*/*l*	Setting of nephelometer scale	Mg *mg*/*l*	Average of five settings of scale	Mean deviation of readings %	Ca found *mg*/*l*	Error %
25.0	30	25.0	29.0	2.8	25.9	+3.6
25.0	30	10.0	29.6	1.6	25.3	+1.2
12.5	50	12.5	48.4	1.8	12.8	+2.4
12.5	40	5.00	39.2	1.6	12.8	+2.4
6.25	50	6.25	49.2	2.0	6.35	+1.6
6.25	50	2.50	49.4	1.0	6.33	+1.3
3.125	50	3.125	44.6	1.6	3.51	+12
3.125	50	1.250	49.4	1.5	3.17	+1.4
1.563	60	1.563	50.6	2.2	1.80	+15

ないが，1～3 *mg*/*l* では大きな誤差を起すようである。しかし多くの陸水では Mg は Ca より少く，5 *mg*/*l* 以下，多くの場合 1 *mg*/*l* 位であり，しかし Ca 含量は概ね 5 *mg*/*l* 以上であるから，一般陸水の研究には支障はないと考えてよい。

更に Mg 以外に自然の水に含まれる種々の化学成分が本比濁法に及ぼす影響について吟味するために，水道水及び半鹹水の Ca 量を先ず容量分析法により決定し，之に一定量の Ca を加えたものについて本比濁法により分析した。その結果は第 4 表に示すように，容量分析値を標準とすると，比濁値の偏差は平均 4.9%，最大偏差 9.8% であつた。また水道水と半鹹水とを比較すると，平均偏差は前者

TABLE IV. *The effect of dissolved constituents of natural waters upon the determination.*

Sample waters	Concentration of calcium in sample waters *mg/l*					
	by volumetric method	determined by nephelometric method				Difference %
		standard		sample water		
		mg/l	readg.	readgs.	concn. found	
A tap water	16.7	25.0	30	41.8	17.9	+7.2
A brackish water	125.0	10.0	40	33.4	120	−4.0
A tap water to which added varying amounts of calcium	28.4	20.0	40	28.6	28.0	−1.4
	18.4	20.0	40	42.4	18.8	+2.2
	13.4	10.0	50	40.2	12.5	−6.7
A diluted brackish water to which added varying amounts of calcium	26.3	20.0	40	28.0	28.6	+3.7
	16.3	20.0	40	44.6	17.9	+9.8
	11.3	10.0	50	44.4	11.2	−0.9

が 3.3%，後者が 6.5% で Mg その他の異物が多い半鹹水の方が偏差は大きいようである。

総　　括

（1） 水中溶存カルシウムの迅速微量定量法として，蓚酸アンモニヤの粉末を加えて生ずる白濁を比濁する操作を採用し，精度，pH, Mg その他の異物の影響について精査した。

（2） 本比濁法の精度は 0.4～50 *mg/l* の範囲では平均誤差 3.4%，最大誤差 8.5 %であつた。

（3） pH 1.5 以上 の供試水では試薬添加後の pH は 4.5 以上であつて，この程度の酸度は定量的に白濁の生成することを阻害しない。

（4） Mg は Ca と等量存在しても Ca 量が 6 *mg/l* 以上であれば殆ど影響はない。

（5） 淡水に存在する程度の水溶成分は殆ど定量に影響しない。半鹹水の場合には多少過大の値（平均誤差 6.5%）を示すようである。

水の微量分析法に関する研究　第13報
緩衝價の小さい陸水のpH測定法

Studies on Micro-chemical Methods for Water Analysis XIII. A Method for the Determination of pH of Fresh Water Having a Small Buffer Capacity.

富山哲夫・矢吹耀男・石尾眞彌
T. TOMIYAMA, T. YABUKI and S. ISIO
（九州大学農学部　水產化学教室）

In determining pH of water having a small buffer capacity divergent values for pH were obtained by the ordinary method, whereas by Tomiyama's method[2] a consistent value was obtained irrespectively of the values for the buffer capacity of sample waters. Experiments have been carried out to see an extent of error in the measurement of pH of waters having small buffer capacity. The magnitude of error was found to be of valiance not only with buffer capacity but also with pH value of a sample water. This phenomenon has been elucidated by taking into account the variation in buffer capacity with pH value of the water.

A mathematical treatment has been made to find out a formula which enables us to calculate the magnitude of the deviation by knowing values for pH and the buffer capacities of a sample water and an indicator. It has clearly been shown that the values for the deviation calculated by use of the present formula were in good agreement within the experimental error with those obtained in the present experiments.

緒　　言　本邦の陸水の多くは軟水であつて，緩衝價は小さく，特に山間部の冷湧水には溶存物質が少く且大部分珪酸より成り，緩衝價の極めて小さいものが多い。例えば著者の一人（富山）が分析した結果の二三を挙げれば，第一表の如くである。

TABLE I. *Certain spring waters in mountaneous region.*

Localities	Total solid *mg/l*	Alkalinity *cc* 0.1 *N* HCl/100*cc*	SiO_2 *mg/l*	SiO_2 per cent of total solid
Kirin lake, Yubuin, Oita Pref.	105	0.88	81.0	84
Oizumi hatchery, Yamanashi Pref.	65.6	0.53	47.6	73
Chitose hatchery, Hokkaido.	105	0.54	45.4	43
Nikuchi hatchery, Yamagata Pref.	45.2	0.27	18.0	40
Fuji hatchery, Shizuoka Pref.	75.8	0.57	29.5	39
Shiobara hatchery, Tochigi Pref.	113	0.61	39.7	35
Akeshina hatchery, Nagano Pref.	69.1	0.77	20.5	30

がように緩衝價（以下 β と記す）の小さい陸水の pH を測定するに当つて，指示薬の種類によつて

（昭和 24 年 8 月 1 日受理）

(1) KOLTHOFF and KAMEDA: J. Amer. Chem. Soc., **53**, 825 (1931).
(2) 富山，渡辺：農化., **14**, 189 (1938).

異つた pH 値を見出すことが屢々経験される。例えば pH 7.4 附近では B.T.B. の値と P.R. の値とが一致を欠き，又同化作用で pH 8～9 となつた場合には P.R. の値と T.B. の値とが全く一致しないことが多い。この現象は指示薬が弱酸性であることに基く誤差 (1) であつて，isohydric indicator を使用するか或は指示薬の量を逓減する drop method による時はこの誤差を除きえられる筈である。しかし野外での測定法としては之等の方法は繁雑で実用し難い。他方，著者（富山）の報告した携帯比色計を用うる pH 測定法は，二色性指示薬によると ±0.02 pH の精度をもち，しかも液層 15 *cm* を通して比色するので，供試水中の指示薬濃度は $2.4 \sim 3.9 \times 10^{-6}$ *Mol/l* で充分であつて，常法の場合の 1/10 程度の指示薬濃度で測定できる。従て β の小さい供試水では指示薬誤差も無視し得る程度と推定され，また標準比色管列も必要としないから，野外での測定法としても理想的な方法と考えられる。

依て本報告では，水道水及び井水を種々に稀釈した供試水について著者の方法の精度を吟味し，更に標準比色管列を用うる普通比色法の誤差を検討した。また指示薬の β 及び供試水の β の値が誤差に及ぼす影響，指示薬に基く誤差の最も起り易い pH の範囲等につき解明し，またこの誤差を理論的に算出する方法についても論考した。

研究方法，結果及び論考

1. 研究方法

指示薬としては B.T.B., P.R., T.B.（Kahlbaum 製品）及び C.R.（武田製品）を選んだ。二色性指示薬の 1 價及び 2 價のアニオンをつくるには，必要な 0.05 *N* NaOH を加えて溶解し，B.T.B. は 0.1 %，P.R. は 0.05 % の原液をつくつた。次に種々の pH をもつ指示薬溶液をつくるには，1 價と 2 價のイオンを第 2 表に示したよう配合割合に混合し，然る後に之を 5 倍に稀釈して B.T.B. は 0.02 %，P.R. は 0.01 % として使用した。尚，混合した指示薬溶液は長時間保存すると pH 値が変

TABLE II. *Ratio of mixing of monovalent and divalent anions of indicators.*

Indicator	HI′ : I″		pH of resultant solution of the indicator	Indicator	HI′ : I″		pH of resultant solution of the indicator
B. T. B.	9.78	1	6.2	C. R.	8.0	1	7.4
	3.90	1	6.6		6.3	2	7.8
	3.10	2	7.0		6.3	5	8.2
	6.17	10	7.4		3.0	6	8.6
P. R.	8.32	1	7.0	T. B.	5	1.0	8.2
	3.32	1	7.4		6	3.0	8.6
	2.64	2	7.8		4	5.0	9.0
	5.25	10	8.2		2	6.3	9.4

化するので，既知の pH を有する指示薬溶液は実験の都度調製した。実験に供した水は東京市水道水及び九州大学農学部の井水であつて，pH 7 附近の実験には採水後 12 時間放置したものを使用し，pH 8.5 附近の実験には井水をテレックスフラスコを用いて煮沸したる後，冷却して用いた。水道水のアルカリ度は 0.86 *cc* 0.1 *N* HCl/100 *cc* であり，井水のそれは 1.34 であつたので，炭酸を除いた蒸溜水で稀釈して種々のアルカリ度の値をもつ供試水をつくつた。

pH の測定は通常法の場合には 5 cc 供試水に 0.5 cc の指示薬を混和してから，Walpole の Comparator を用いて比色し，富山式携帯比色計を用いる場合には供試水 20 cc* に 0.2 cc の指示薬を混和してから，これを枝をもたない比色管 A に加え，比色円管 a を A の目盛 100 に固定する。他方，蒸溜水 40cc** に 0.4 cc の指示薬を混和した後，約二等分し，一つには 1 滴の 10% Na_2CO_3 を，他

TABLE III. *The pH values measured by using brom thymol blue by* TOMIYAMA'S *method (T. method) and the ordinary method (O. method) for waters having various buffer capacities.*

pH of B. T. B. soln.	Alkalinity 0.86*			Alkalinity 0.37*			Alkalinity 0.22		
	T. method	O. method	error	T. method	O. method	error	T. method	O. method	error
HI′	7.20	7.1	−.10	7.09	6.9	−.20	6.82	6.7_5	−.08
6.2	7.20	7.1	−.10	7.09	6.9_5	−.15	6.83	6.7_5	−.08
6.6	7.20	7.1	−.10	7.09	7.0	−.10	6.82	6.8	−.03
7.0	7.20	7.2	.00	7.09	7.0	−.10	6.82	6.9	+.07
7.4	7.20	7.2_5	+.05	7.11	7.1	.00	6.84	6.9	+.07
I′′	7.20	7.2_5	+.05	7.11	7.1	.00	6.84	7.0	+.17
Mean	7.20			7.10			6.83		

* The determination of pH value by using p-nitrophenol gave 7.21 for water having alkalinity of 0.86, and 7.05 for water having alkalinity of 0.37.

TABLE IV. *The pH values measured by using phenol red by* TOMIYAMA'S *method and the ordinary method for waters having various buffer capacities.*

pH of P. R. soln.	Alkalinity 0.86*			Alkalinity 0.42*			Alkalinity 0.22		
	T. method	O. method	error	T. method	O. method	error	T. method	O. method	error
HI′	7.20	7.1_5	−.06	7.20	7.0	−.20		6.7_5	−.05
7.0	7.20	7.2	.00	7.20	7.1	−.10		6.8	.00
7.4	7.20	7.2	.00	7.20	7.2	.00	6.80**	6.8	.00
7.8	7.23	7.2_5	+.04	7.20	7.2	.00		6.9	+.10
8.2	7.20	7.2_5	+.04	7.20	7.2	.00		6.9	+.10
I′′	7.23	7.2_5	+.04	7.20	7.2_5	+.05		7.0	+.20
Mean	7.21			7.20					

* The determination of pH by using p-nitrophenol gave 7.21 for water having alkalinity of 0.86, and 7.18 for water having that of 0.42.

** Since pH value of this sample water was near to the extremity of color change of phenol red, brom thymol blue was used.

* 供試水の量は比色管の経を 7 mm 程度に縮少すれば，10 cc の供試水で充分に測定ができる。

** 野外では蒸溜水を用いることは不便であるから，次の簡易法が適している。供試水約 50 cc に指示薬 0.5 cc を混和し，その約 20 cc を一つの比色管 A に加える。残りの約 20 cc には 1% NaOH を含む 40% ロッセル塩液（アンモニヤ定量用試薬）を 1 滴加えてアルカリ色をつくり，比色管 B に加え，残りの 10 cc には稀醋酸を 1 滴加えて酸性色をつくり，比色円管 b に加え，本文に記載した要領で比色する。

の一つには 1 滴の稀醋酸を加えて，指示薬のアルカリ色及び酸性色をつくり，前者は枝付比色管 B に移し，後者は比色内管 b に加える。次に比色内管 b を動かし，絶えず b 内の液高を目盛 100 に合せつゝ比色管 A，B が同一色調を示す時の読み h を求める。この値を $pH=pKa+\log h/(100-h)$ に入れて pH を算出する。但し pKa は指示薬の解離恒数値。

2. pH を異にする指示薬が種々の β をもつ水の pH 測定に及ぼす誤差

種々の β の値をもつ供試水に種々の pH をもつ各種指示薬を加えて，通常法及び富山法によつてpHを測定し定した結果は，第 3 表より第 6 表迄に示す如くであつた。

TABLE V. *The pH values measured by using cresol red by* TOMIYAMA'S *method and the orginary method for waters having various buffer capacities.*

pH of C. R. soln.	Alkalinity 0.90			Alkalinity 0.45			Alkalinity 0.23		
	T. method	O. method	error	T. method	O. method	error	T. method	O. method	error
HI′	8.50	8.4	−.10	8.46	8.0	−.49	7.99	7.9_5	−.06
7.4	8.50	8.5	.00	8.49	8.1	−.38	8.01	8.0	−.01
7.8	8.50	8.5	.00	8.48	8.2	−.29	8.03	8.0	−.01
8.2	8.51	8.5	.00	8.49	8.3	−.19	8.01	8.1	+.09
8.6	8.50	8.6	+.10	8.51	8.4	−.09	7.99	8.3	+.29
I″	8.48	8.6	+.10	8.51	8.5	+.01	8.01	8.4	+.39
Mean	8.50			8.49			8.01		

TABLE VI. *The pH values measured by using thymol blue by* TOMIYAMA'S *method and the ordinary method for waters having various buffer capacities.*

pH of T. B. soln.	Alkalinity 0.90			Alkalinity 0.45			Alkalinity 0.23		
	T. method	O. method	error	T. method	O. method	error	T. method	O. method	error
HI′	8.48	8.5	+.03	8.45	8.2	−.27		8.0	+.01
8.2	8.48	8.5	+.03	8.45	8.3_5	−.12		8.2	+.21
8.6	8.45	8.5	+.03	8.48	8.5	+.03	7.99	8.3_5	+.36
9.0	8.45	8.5	+.03	8.48	8.6	+.13		8.5	+.51
9.4	8.45	8.6	+.13	8.45	8.7	+.23		8.7	+.71
I″	8.48	8.6	+.13	8.48	8.7_5	+.28		8.7	+.71
Mean	8.47			8.47					

富山法によると β の小なる水の場合でも，指示薬自身の pH がかなり変動していることの影響は全く見られなかつた。しかもこの測定の平均誤差は 0.01 であつた。之に反して常法によると，水道水そのまゝでは 0.1 以下の誤差を起す程度であつたが，この誤差は β の小さくなる程増加する傾向にあり，また指示薬の pH が isohydric より遠ざかる程誤差は大となり，富山法との差が 0.7 にも達する場合

が見られた。

3. 水の β の大さ及び緩衝範囲と指示薬の β との関係が pH 測定誤差に及ぼす影響

指示薬の酸誤差は前項で吟味したように，供試水の β 及び指示薬溶液の pH により支配されること勿論であるが，また供試水並に指示薬の緩衝範囲によつても支配される筈である。依て通常比色法で加えられた指示薬濃度の β を算出すると，各種指示薬について第 1 図に示すような値を示した。但し第 1 図には β の値を 5 倍に拡大して示してある。他方，陸水の β は大部分炭酸及びその塩によるものであるが，一つの代表として東京都の水道水について pH を測定しつゝ滴定し，それから β を求めてみた。その結果は第 1 図に示すように β の最大は pH 6.4 附近にあつて，この供試水のアルカリ度及び炭酸の第一解離恒数値[3]から計算した β の値とよく一致しているので，炭酸一重炭酸塩による緩衝であることは明瞭である。

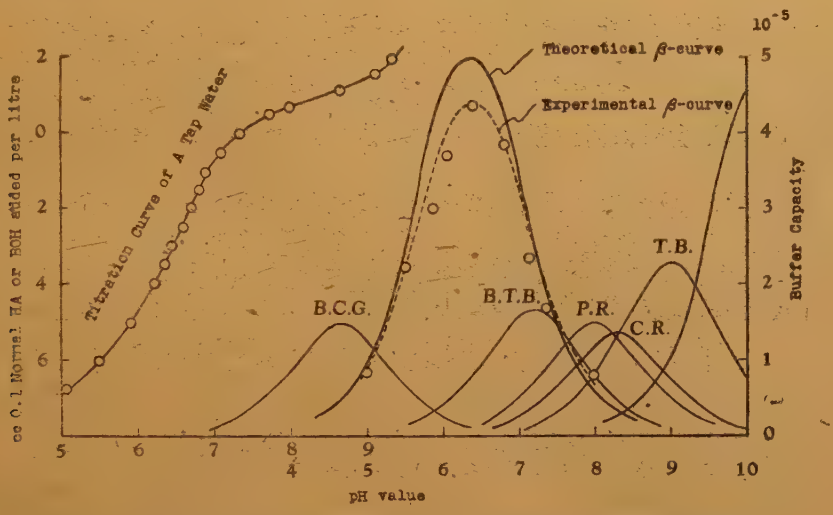


Fig. 1. Buffer capacity-curves of a tap water and several indicators. The values of the indicators are shown on a scale enlarged five times.

第 1 図から明らかなように，pH 6～7 の範囲では緩衝物質の濃度が著るしく小さい水の場合にも，その β は指示薬の β より遙に大であるから，指示薬自身の pH に基く誤差は第 3 表及び第 4 表に見られるように概ね 0.1 以下である。しかし水の pH が 8.4 附近（pH 5.0 以下も同様）では β は極めて小さいので，指示薬に基く誤差は第 5 表及び第 6 表に示したように著るしく大きく，最大 0.7 にも達した。また同じ β と同じ pH 値をもつ供試水の pH を T. B. 及び C. R. で測定した値は 0.2～0.3 の変異を示した。従て pH 8～9 の陸水に於て，特にアルカリ度が小で，異る指示薬を用うると異つた pH を示した場合には，その測定値には信用がおき難く，富山法によつて眞に近い pH 値を求めるべきである。

4. 指示薬誤差に関する理論的考察

或る pH で一定の β をもつた水に，或る pH で一定の β をもつた指示薬を加えた結果起る pH のズレを理論的に検討してみよう。今第 2 図に示した例について検討してみると，$B_1'+B_1^*$ なる β を

(3) MAC INNES, D. A., and BELCHER, D.: J. Amer. Chem. Soc., **55**, 2630 (1933).

* B_1 は水中の $HCO_3' \rightleftarrows CO_3'' + H^+$ なる緩衝物質の示す β 値，B_1' は $H_2CO_3 \rightleftarrows HCO_3' + H^+$ なる緩衝物質の示す β 値。

もつ供試水の pH 値 A が，指示薬を加えた爲にその β は B_2+B_2' となり Z なる pH にづれ，同時に指示薬のもつ β 即ち b_1 及び pH 値 a がそれぞれ b_2 及び Z にズレたとすれば，水の pH が A より Z まで動いたときの β の積分値即ち β 曲線図に於ける $AZB_2B_1+AZB_2'B_1'$ なる面積と，他方指示薬の pH が a より Z まで動いたときの β の積分値即ち aZb_2b_1 なる面積とが同一であるべきである。

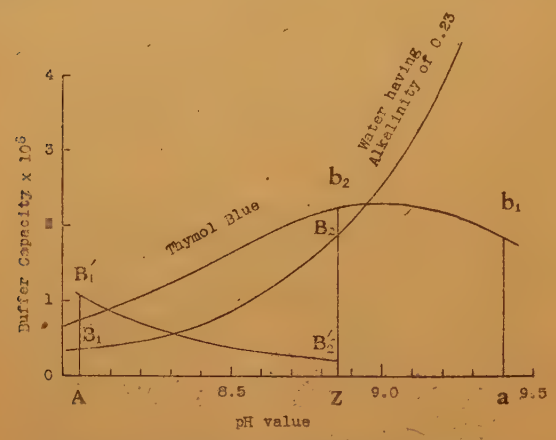


Fig. 2. An example of calculating the resultant pH value by knowing the buffer values of a sample water and thymol blue.

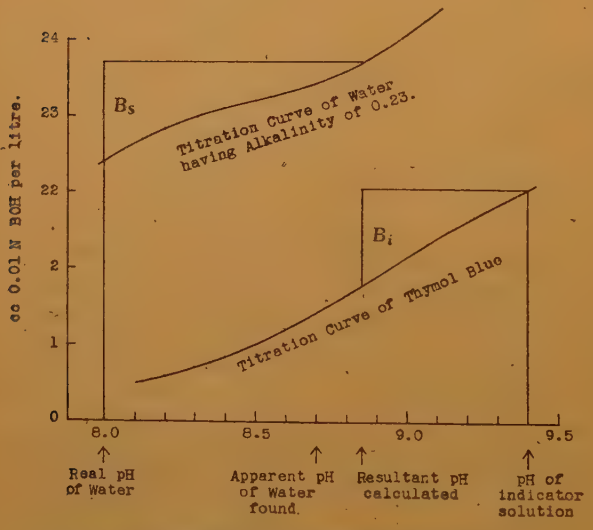


Fig. 3. An example of calculating the resultant pH value by plotting the titration curves of a sample water and thymol blue.

指示薬の pH 値 a は解離恒数値を pKi とすると，$pKi+\log di/(1-di)$ で示され，指示薬には di なるアルカリが加えられているので，弱酸なる指示薬が a なる pH に達する迄の β の積分値は $diCi$ である。但し Ci は水に加えた後の指示薬のモル濃度。次に水に加えた指示薬が Z なる pH にズレると，$pKi+\log x/(1-x)=Z$ を満足するだけのアルカリの x だけの増減が必要であつて，Z に達する迄の β の積分値は xCi となる。從て指示薬の pH のズレによる β の変化量は面積 $aZb_2b_1=xCi-diCi$ で示される。他方，同様に供試水の眞の pH 値 A では，緩衝物質の解離恒数値を pKs にて示すと，$pKs+\log ds/(1-ds)$ に相当する ds なる塩を含み，A なる pH を示す迄の β の積分値は $dsCs$ である。但し Cs は水中の緩衝物質のモル濃度。指示薬を加えた爲に pH が A より Z にズレると，$Z=pKs+\log y/(1-y)$ であり，A より Z 迄の β の変化量即ち面積 $AZB_2B_1+AZB_2'B_1'=dsCs-yCs$ となる。然る時は Z なる pH に於ては次の二つの方程式が成立せねばならない。

$$xCi-diCi=dsCs-yCs$$

$$pKi+\log x/(1-x)=pKs+\log y/(1-y)$$

之等の式で x, y 以外は既知であるから，この二式より x 或は y を求めて Z を算出することができる。

或は簡單に図によつて求めるには，第 2 図に示したように指示薬又は供試水の β の積分値を面積から求め，双方が等しくなるような Z の値を求めればよい。或は更に簡單なのは，第 3 図に示したように

供試水のアルカリ度の値及び加えられた指示薬の濃度から供試水及び指示薬の理論的な滴定曲線を作図し，指示薬のもつ pH 値から或る pH 迄の変化に必要なアルカリ量を Bi とし，他方供試水の眞の pH 値から或る pH 迄の変化に要するアルカリ量を Bs とすれば，$Bi=Bs$ を満足する pH 値を求めればよい。

TABLE VII. *A comparison between pH values for sample waters obtained by the ordinary method and those calculated from buffer capacities of sample waters and indicators.*

Indicator	pH of indicator soln.	pH found	pH calc.	difference	pH found	pH calc.	difference
B. T. B.		Alkalinity 0.37			Alkalinity 0.22		
	6.2	6.9_5	7.02	.07	6.7_5	6.77	.01
	6.6	7.0	7.04	.04	6.8	6.80	.00
	7.0	7.0	7.09	.09	6.9	6.85	.05
	7.4	7.1	7.13	.03	6.9	6.90	.00
P. R.		Alkalinity 0.42			Alkalinity 0.22		
	7.0	7.1	7.19	.09	6.8	6.81	.01
	7.4	7.2	7.22	.02	6.8	6.84	.04
	7.6	7.2	7.25	.05	6.9	6.92	.02
	8.2	7.2	7.30	.10	6.9	7.00	.10
C. R.		Alkalinity 0.45			Alkalinity 0.23		
	7.4	8.1	8.10	.00	8.0	7.82	.18
	7.8	8.2	8.18	.02	8.0	7.92	.08
	8.2	8.3	8.34	.04	8.1	8.10	.00
	8.6	8.4	8.55	.15	8.3	8.31	.01
T. B.		Alkalinity 0.45			Alkalinity 0.23		
	8.2	8.3_5	8.36	.01	8.2	8.11	.09
	8.6	8.5	8.55	.05	8.3_5	8.36	.01
	9.0	8.6	8.73	.13	8.5	8.63	.13
	9.4	8.7	8.86	.16	8.7	8.86	.16

以上の計算法で求めた pH 値を常法による pH の実測値と比較すると，第 7 表に示す通りであつて，この表から明かなように実測値と計算値との差は，常法に於ける誤差の範囲 0.1 以下の場合が 81 % を占めているから，上記の計算が妥当なものと考えてよい。從て指示薬の pH，供試水のアルカリ度及び富山法による pH 値とがわかれば，常法による誤差の値は容易に算出することができる。また供

試水のアルカリ度，富山法と常法との誤差が実験的に得られると，前二式の x，y，ds が判るので，di が求められ，從て指示藥の pH の概値を算出し得られる。

摘　　要

1) 種々の pH 値をもつた指示藥溶液を種々の β をもつた水に加えた場合，富山法のように供試水中の指示藥濃度が 2.4～3.9×10-6 *Mol/l* の時には常に同一 pH を示すに反して，普通法のように2.4～3.9×10-5 *Mol/l* の時には β が小となる程誤差は大きく，最大 0.7 にも達した。

2) 指示藥誤差は同一アルカリ度の水でも，その pH 値によつて差異を示した。即ち供試水の pH が 7 附近の場合よりも pH 8～9 の場合の方が指示藥に基く誤差が著るしく大きい。この理由を緩衝價曲線によつて解明した。

3) 供試水並に指示藥溶液の pH 値，供試水並に指示藥溶液の β の値を用いて，常法による pH 測定値のズレの値を求める方法について論考し，この計算値と実測値とを比較したところ実驗誤差の範囲内でよい一致を示した。

底土に含まれる硫化物の少量定量法*

富山哲夫・神崎嘉瑞夫
（九州大学農学部・水産化学教室）

A Semi-micro Method for Determination of Sulfide Contained in Muddy Deposits

TETUO TOMIYAMA and KAZUO KANZAKI

A semi-micro method and an appropriate apparatus suitable for the method (Fig. 1) have been described.

It has been observed that the distillation of hydrogen sulfide by using the present apparatus takes only five minutes (Table 2). The distillate shall be absorbed by zinc acetate instead of iodine solution because of the fact that a highly diluted iodine solution is liable to change its concentration due to evaporation especially when mixed with a warm distillate (Table 1). A comparison between the carbon dioxide-aeration method and the present one has been made on a sulfide solution with a fairly good agreement in average (Table 3 and 4).

I. 緒　　言

河川，湖沼及び海湾の底土は餼泥と腐泥とに大別される。餼泥は多少通気状態の下に於ける沈澱物であつて一般に灰色であるのに対し，腐泥は有機物を細菌が無酸素状態で分解する時に形成されたもので，硫化鉄の存在のために黒色を呈する。多くの場合，腐泥中には遊離硫化水素が多少存在するので，餼泥と異つて酸素呼吸をする大形の底棲生物の棲息は全く許されない。

硫化物及び硫化水素の毒性については，富山・山川[1]は鯉に対する毒性を，土屋氏[2]はミジンコに対する毒性を試験し，pH 7 以下では 0.5～1 mg./l. にて約 24 時間に斃死することを明かにした。それ故に底土の硫化物及び硫水水素量を知ることは，その場所の汚濊状態或は汚濊の歴史を推知する上に有益な資料となり，水産物の生産力を知る上にも緊要な指標と考えられる。既往の文献をみると，次のような多数の研究によつて底土中の硫化物含量の重要性が理解される。例えば陸水学方面では，宮地氏[3]は底土中に硫化物を含む湖沼には底棲動物が少いことを明かにし，吉村氏[4]は水月湖の硫化水素量は硫酸塩の減少によつて説明されると報告し，また吉村・和田両氏[5]は浜名湖の堆積物の硫化物含量と深度との関係を吟味している。水産学方面では，三方湖群の水質の悪変による魚類の斃死は，海水流入によつて硫化物が新成したためであると推定した川名氏[6]の研究がある。この推定は三方湖の底土に含まれる硫酸塩還元菌に関する木俣氏[7]の研究，及び硫化物の新成と消失との平衡を論じた岡田氏[8]の研究によ

---

* 水界の生産力を支配する要因に関する研究（第6報）
本研究の一部は昭和16年4月の日本水産学会年会にて発表した。

昭和25年9月7日 受理

り確証された。また清石，富山[9]は浜名湖の牡蠣斃死率が底土の硫化物含量により支配されることを明かにした。更に清水・倉茂両氏[10]は佐鳴湖の魚族斃死は硫化水素によることを示し，清石，稲葉，富山[11]もまた佐鳴湖の生産量は底土の硫化物含量により制約されることを指摘した。清石，富山，小島[12]並に富山，稲葉，小島，佐々木[13]は駿河湾の桜エビ漁場に対する製紙工場廃水の影響，並に宮崎県土々呂湾に於けるベンベルグ工場廃水の影響は，底土中に於ける硫化物の分布によつて明かにしえられないことを報告した。

さて，従来底土の硫化水素及び硫化物の定量法として提唱されている種々の方法を検討してみると，硫化物より生じた硫化水素を駆逐する方法には，炭酸ガスによる方法[7][14][15]，水素による方法[16]，水蒸気蒸溜による方法[5]があり，次に駆逐した硫化水素を定量するには，酸化したのち硫酸バリウムとして秤量する方法[14]，沃度液に直接吸収させてヨードメトリーにより定量する方法[17][5]，醋酸亜鉛又は醋酸カドミウムに予め吸収したのちヨードメトリーにより定量する方法[15][18]，醋酸鉛に吸収して比色する方法[19]，等に分類される。之等の方法に於ては，定量に概ね1時間を要するので，多数の試料についての定量には甚しく不適当である。

硫化物を含む底土は酸素に鋭敏であるから，採泥後成るべく早く，出来れば現場近くで分析することが望ましい。従て生産力の調査には，定量法としては精密なものよりも，少量の供試料で簡単に操作できるものが適当している。依て著者等は 0.2～2g. の底土を供試し，微量化した滴定操作[20]によつて短時間に定量せんと試み，先づ水蒸気蒸溜法と炭酸ガス通気法とを比較したところ，微量水蒸気蒸溜法は充分満足すべきものであることを確かめた。更に溜出した硫化水素の捕集法として，沃度吸収法，金属塩吸水法につき比較吟味した。これらの結果に基いて一少量定量法を定めることができたので，以下報告する次第である。

II. 定 量 方 法

1. 定量に要する試薬

b) 0.1 n チオ硫酸ソーダ：5.0 g. チオ硫酸ソーダ $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ を200 cc. 水に溶解し，無水炭酸ソーダ 0.5 g. を加えて保存する。この液の力価を決定するには，0.2 cc. 10%沃化加里に約 5cc. の水と 0.2 cc. 稀硫酸（1：3）とを加えた混合液に，1 cc の標準 0.01 n 重沃度酸加里 KHI_2O_6 を混和し，遊離した沃度を上記のチオ硫酸ソーダ液にて，ミクロビユレツトを用いて滴定し，ビユレツトの目盛Rを求める。しかる時は実際の定量の時の滴定値 T は 0.01 n の $T \times \frac{1}{R}$ cc. に相当する。

b) 0.01 n 沃度液：10g.の 沃度加里を少量の水に溶解し，之に沃度 1.27g. を溶解して後 100 cc. とし，原液として褐色瓶に保存する。之を使用の際 10 倍に稀釈して約 0.01 n の液をつくる。

c) 10%醋酸亜鉛液：市販品には不溶性不純物を含むので，醋酸酸性の過飽和液より再結したものを用いた方がよい。

d) 稀塩酸（1：1）：黄色に着色した塩酸は使用してはいけない。

e) 0.5 % 澱粉液：局方澱粉 1 g.を煮沸した 1 % サルチール酸 100 cc. に加え，攪拌しつつ 5～10 分間弱く煮沸して乳白色より半透明に変じた時，水で 200 cc. に稀釈する。

2. 定 量 装 置

硫化水素の蒸溜には，著者の一人（富山）が窒素の定量用に考案し昭和7年以来使用しているアンモニヤ蒸溜装置を使用する。この装置は第1図 A，B，C，D に示す如きもので，之等はいづれも性能に変りはない。A，B は最初に製作したもので，封じ込みが多いので製作にも多少の困難があり破損も

多い。C, D は之等を簡易化したもので，ゴム栓をいためる瓦斯以外のものの蒸溜には支障は全く起らない。之等の装置による蒸溜速度が早いのは，瓦斯発生部 c の外部を水蒸気外套 h としたためであろう。窒素定量の場合と異る点は，硫化水素受器 d に達する冷却管 f の先端を取外しえられるようにしたことで，先端の管の内部に附着した硫化亜鉛が溶解除去され難いためにこのように変改した。

第 1 図

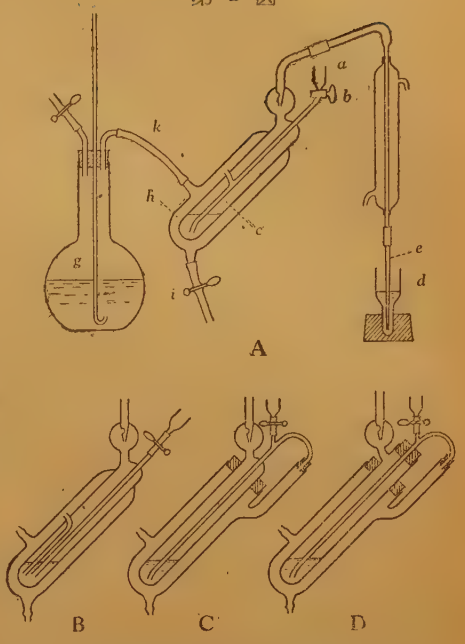


Fig. 1 Showing a Set of Apparatus for Determination of Sulfide (A) and Several Types of Steam-distilling Apparatus (B, C, and D).

3. 定 量 法

採泥器で採取した供試泥は，適当の大さの硝子円筒瓶に気泡の入らないように充満する。もし遊離硫化水素を定量しない場合には，100g. の底土に対し 20 % 苛性ソーダ約 1 cc. の割に加えて遊離硫化水素を固定すべきである。密栓を施してから，なお空気に触れるのを避けるために水を充した容器中に沈めて実験室に運ぶ。

供試泥は硫化物の含量の多少に従い，0.200～2.00g. を秤取し，試料注入部 a に蒸溜水を以て洗い込み，活栓或はピンチコック b を開いて蒸溜管 c に移し，次に 2 cc. の稀塩酸 (1:1) を加え b を閉す。他方，蒸溜受器 d に 5 cc. の 10%醋酸亜鉛液を加え，先端を細くしたガラス管 e をゴム管にて冷却管 f と接続する。次にコック i を開きコック j を閉じて予め沸騰発生させたフラスコ g の水蒸気を h なる蒸気外套に通じる。蒸気が放出口より排出するに及んで，コック i を閉じて水蒸気を c 内に通じ，蒸溜を開始する。蒸溜液が溜出し始めてから約 5 分後，即ち蒸溜液が約 20 cc. となれば，f より e を取外し，蒸溜受器 d と共に滴定操作に移す。蒸溜が終れば，j を開き g と h との中間のゴム管 k をピンチコック或は指にて閉塞する時は，蒸溜残渣は h に逆流する。次に a より適当量の水を入れて，前記同様の操作で h に逆流させることを二回繰り返せば，完全に洗滌ができる。

蒸溜液の受器 d には 1 cc. の 0.01 n 沃度液を混和し，もし速に沃度の色が褪色する場合には，更に 1 cc. を追加する。次に 2cc. の稀塩酸(1:1)を混和し，ミクロビュレットを用いて 0.1 n チオ硫酸ソーダにて滴定し，終点近くに澱粉液を加え，青色の消失するまで滴定する。但し硫化物の多い場合には，沃度によつて酸化生成したコロイド状硫黄のために，沃度澱粉反応の消失の鮮明度がさまたげられる。この場合には概ね青色が褪色した後に，なお過剰のチオ硫酸ソーダ液の一定量を加え，次に 0.1 n沃度液を以て青色の現われる迄滴定する方が終点の判別が容易であるから，この方法で真の滴定値を求めた方がよい。滴定値より乾燥供試泥 1000 g. 中の硫化物を算出するには次式による。

$$(I-H) \times \frac{1}{R} \times 0.1603 \times \frac{1000}{S \times D} = \text{Sulfide} - S\ ‰$$

I：盲検値，即ち供試料の代りに蒸溜水約 5 cc. を加え，定量と同様の条件で操作した時のチオ硫酸ソーダによる滴定値（ミクロビュレットの読み）。

H：実験値，溜出液中の硫化亜鉛を酸化して後，過剰に残存する沃度液を 0.1 n チオ硫酸ソーダにて滴定した時のミクロビュレットの読み。

R：5 cc. の水に 0.2 cc. 10 % KI 及び 0.2 cc. 硫酸 (1:3) を加えたものに，1 cc. の 0.01 n KHI_2O_6 を加えて遊離した沃度液を，0.1 n チオ硫酸ソーダにて滴定した時のミクロビュレットの読み。

S：定量に用いた泥の重量 mg.

D：1 mg. の供試泥中の固形物量 mg.

底土の固形物の定量：上記のように供試泥 1000 分中の硫化物を算出するために，固形物の定量が必要である。この定量は常法によつて差支えないが，底土は多くの場合均一性を欠くので，精密に 1～2 回の定量を行うより，多少の精度は落しても簡易法で二回以上定量した値の平均が真に近いものと考えられる。依て著者等は次のような簡易法を採用した。先づ薬包紙を ¼ の大さに切り，之で小型のコップ状の容器を多数つくり，その一つを風袋とし，他はみなこの風袋と一致するように調節する。次に供試泥 2 g.内外を前記の紙製容器にとり秤量した後，100°C. の乾燥器に約 12～15 時間乾燥し，次にデシケーターにて放冷して再び秤量し，固形物を算出する。なお秤量には化学天秤の必要なく，2～5 mg.迄秤量できる調剤天秤で充分である。

III. 實 驗 の 部

1. 硫化物溶液の調製

硫化物の稀薄溶液は比較的不安定であるから，定量法に関する吟味を進めるに当つて，硫化物の標準としてどの形のものを用うべきかにつき予備試験した結果，次のような方法によつて調製した稀薄硫化ソーダ溶液は，10 時間以内では変動が少いので，之を定量法の吟味に使用した。

蒸溜水約 300 cc. を煮沸し，Fig. 2 の A に加え，キップ装置より水素を通じつつ冷却し充分に酸素を除いておく。別に蒸溜水約 50 cc.を煮沸して酸素を除いたものに，硫化水素を通じて飽和溶液をつくり，この 5 cc. を前記の A に加え，直ちに重炭酸ソーダ約 0.5 g. を混和する。必要な供試液はサイホンによりとり出す。かように調製した硫化物溶液 2 cc. は約 1 cc. 0.01 n 沃度液を消費する。定量法の項に記載した蒸溜法により定量した 22 回の実験値は，蒸溜しないで硫化ソーダ液を醋酸亜鉛液に加え，氷醋酸で弱酸性とした後，0.01 n 沃度液と塩酸とを加えて直接に定量した沃度消費量に比べて，91.0～97.5 %，平均 94.2% ± 1.7% (平均偏差 1.5 %) に相当した。蒸溜による値が直接定量値に達しないのは，蒸溜中に硫化水素が酸化分解するか，充分に吸収されないか，或は供試硫化物に多硫化物が含まれているか，いづれかであろう。しかし 4 項で示すように水蒸気蒸溜法の値は炭酸ガス通気法の値と大略一致するので，蒸溜中に高温のため硫化水素が分解するものとは考えられない。

第 2 図

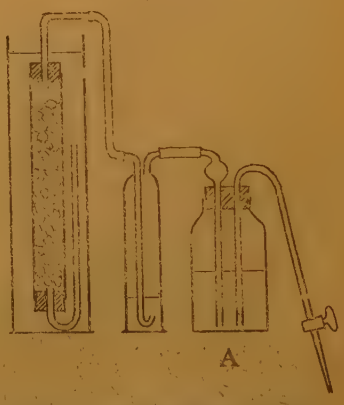


Fig. 2 Showing Reservoir for Sample Sulfide Solution

2. 硫化水素の水蒸氣蒸溜液を沃度液に直接捕集する場合の誤差

吉村氏は STROEDE 氏の研究に倣つて，ケルダール窒素分解フラスコを利用して蒸溜し，リービッヒ冷却管を通した蒸溜液を直接 0.01 n 沃度液に導いて，消費された沃度液から硫化水素量を算出してい

る。著者等も吉村氏と同じ操作を採用し，Fig. 1 A の装置を用いて予備試験を行つたが，一定の定量値がえられなかつたのでその原因を精査した。第一に考えられるのは，蒸溜受器が溜出水によつて温まるために，沃度が散逸するだろうとの疑いである。依て 1 cc. 0.01 n 沃度液及び 15 cc. 水の混合液を 40° に放置し，次に 2 cc. 10 % HCl を加えて滴定し沃度の揮発量を求めたところ，暗所室温に 30 分間放置したものは 2 % であつたが，40° 5 分間放置のものは 29 %，40° 5 分間加温後充分冷却したものは 48 % に達した。更にこの原因が定量結果に及ぼす影響を知るために次の実験を行つた。即ち蒸溜液を 5 % 醋酸亜鉛液で先づ捕集し，充分冷却した後，0.01 n 沃度液の消費量を求めたところ，Table 1 に示すように，1～2% 過少の範囲で一定した値を示したのに反し，沃度液で捕集した場合には 4～10% の誤差を生じた。従て沃度液によつて直接に蒸溜液を捕集することは，実験操作の条件，即ち蒸溜速度，冷却水の温度及び流量等によつて誤差を起しやすいわけであるから，醋酸亜鉛液に捕集する方法を採用した。なお醋酸カドミウムの醋酸溶液を硫化水素の固定液として使用する方法をも試みた結果，醋酸亜鉛の場合と全く同一結果を与えたが，沈澱が酸に比較的難溶なためにこの方法は放棄した。

Table 1 *The Extent of Error in Per Cent of Sulfide Involved in the Absorption of Distilled Hydrogen Sulfide.*

No. of expt.	H_2S absorbed with 0.01 n I_2	H_2S absorbed with zinc acetate
	%	%
1	9.9	1.0
2	10.4	2.0
3	10.4	2.0
4	4.2	2.0
5	4.2	1.0

3. 水蒸氣蒸溜法による硫化水素の溜出速度

Fig. 1 の装置を用いて硫化水素を蒸溜する場合の速度を測定した結果は Table 2 に示したように，溜出速度は著るしく大であり，硫化物の多少に関係なく，一分間に 3～4 cc. 溜出液がえられる程度では，5 分間で硫化水素の溜出が完了する。ところが従来の硫化物の容量定量法に於ける蒸溜時間は，吉村氏の水蒸気蒸溜操作で一時間，米国の公定法（炭酸ガス通気法）では 1～4 時間，独乙の水・土・空気の衞生試験所で採用している Mahrzahn 法の変改法では約 40 分を要するので，多数の試料を急速に分析するには不適当である。本微量法によると，供試料の秤量より溜出液の滴定迄を約 10 分間で操作することができ，一時間に少くとも約 5 回の定量を実施することができる。

Table 2 *The Rate of Distillation of Hydrogen Sulfide.*

Time of distillation	Experiment 1		Experiment 2		
min.	cc. 0.01 n I_2		cc. 0.01 n I_2		
2	0.782	0.945	——	——	——
5	0.125	0	4.90	4.88	4.88
8	0		0	0	0
% Distilled	87.0	91.0	98.0	97.6	97.6

5 分間で蒸溜が完了する条件で供試硫化物液 2 cc. を蒸溜して，0.01 n 沃度液の消費量 A を求め，他方供試液 2 cc. を 10 % 醋酸亜鉛液 5 cc. に加え，醋酸酸性として後 0.01 n 沃度液の消費量 D を求め，A/D × 100 によつて硫化水素の回収率を算出した。その結果は Table 3 に示した通り，92.6～98.0 %，平均 94.5 % の回収率を示した。

Table 3 *The Recovery of Sulfide by the Steam-distilling Method.*

No. of estimation	Hydrogen sulfide distilled by steam	Titrated directly on Na sulfide soln.	H_2S recovered
	cc. 0.01 n I_2	cc. 0.01 n I_2	%
1	0.93	0.95	98.0
2	0.89	0.95	93.6
3	0.89	0.94	94.7
4	0.88	0.94	93.6
5	0.88	0.94	93.6
6	0.87	0.94	92.6
7	0.88	0.94	93.6
8	3.92	4.15	95.2
9	3.89	4.01	95.3
		Average	94.5
		Std. devn.	± 1.50

4. 炭酸ガス通氣法による硫化物の定量

水蒸気により硫化水素を溜出する方法では，100°近くで空気と多少接触するために，蒸溜中に酸化分解する恐れがあるから，炭酸ガスにより駆逐する方法について比較研究した。定量装置としては Fig. 3 に示したものを使用した。a に硫化物 2cc. を加え，密栓した後 c より 5％硫酸 3 cc. を加え，室温にて数分間炭酸ガスを通じた後，煮沸した湯煎鍋に浸し，更に 15 分間炭酸ガスを通じて試料中の硫化水素を 5 cc. の 10％ 醋酸亜鉛液をいれた吸収管 b に移す。以後は定量法の項に記載したと同様の方法で，0.01 n 沃度液の消費量を求め，更に前項に示した方法によつて硫化水素の回収率を算出した。その結果は Table 4 に示したように，91.1～96.0％，平均 93.2％ であつて，水蒸気蒸溜法と大同小異である。しかし通気法によると水蒸気蒸溜法に比し吸収液の容量があまり増加しないので，滴定終点は明瞭であるが，定量に多くの時間を要し，また炭酸ガス通気の調節に熟練を必要とする。

第 3 図

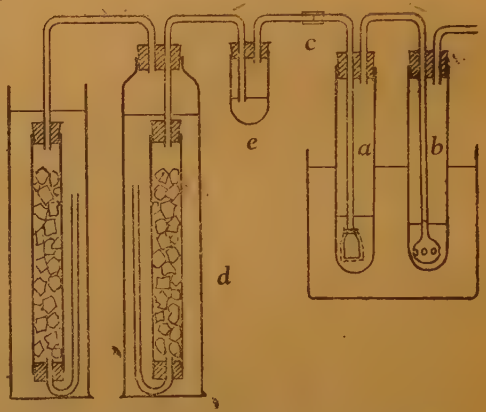


Fig. 3 Showing Apparatus for CO_2-aeration.
a: Sample b: 10% Zinc acetate
c: Connection with rubbertubing
d: CO_2-generator e: Bubble-counter

Table 4 *The Recovery of Sulfide by the CO_2-aeration method.*

No. of expt	Aeration with CO_2	Titrated directly on sulfide soln.	H_2S recovered
	cc. 0.01 n I_2	cc. 0.01 n I_2	%
1	0.83	0.91	91.3
2	0.87	0.91	95.5
3	0.84	0.91	92.3
4	0.84	0.91	92.3
5	0.74	0.79	93.6
6	0.72	0.79	91.1
7	0.41	0.44	93.0
8	0.49	0.51	96.0
9	0.46	0.50	95.8
10	0.40	0.44	90.9
		Average	93.2
		Std. devn.	± 1.87

IV. 総　　括

1. 一回の硫化物の定量を約10分間で完了し得る水蒸気蒸溜法の装置並に定量法について記載した。
2. 水蒸気蒸溜法の結果は炭酸ガス通気法の結果と略々一致する。
3. 硫化水素の水蒸気蒸溜は著者の装置を用うると5分間で完了する。
4. 溜出した硫化水素は沃度で捕集すると，温度の上昇のために沃度の揮発量が増して誤差を招くので，醋酸亜鉛液で捕集すべきである。

本研究の一部は文部省科学研究費によつて遂行できたので，茲に謝意を表する。また故細川栄三郎氏の助力に仰ぐところが多かつたことを特記し，深謝の意を表する。

文　　献

(1) 富山哲夫，山川朝義：日水学., **15**, 491 (1949).
(2) 土屋靖彦：日水学., **13**, 113 (1947)；Jap. Jour. Zool., **3**, 201, 259 (1931).
(3) 宮地伝三郎：水産研究誌, **23**, No. 5 (1928).
(4) YOSHIMURA, S.: Geophys. Mag., **6**, 315 (1932).
(5) 吉村信吉，和田憲夫：陸水学雑誌, **8**, 68 (1938). Stroede, W.: Z. f. Fisch., **31**, 345(1933).
(6) 川名一武：水産研究誌, **23**, 395, 424, 486 (1937).
(7) KIMATA, M.: Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., **7**, 139 (1932).
(8) 岡田光世：日水学., **6**, 327 (1938).
(9) 清石礼造，富山哲夫：日本海洋学会誌, **1**, 75 (1942).
(10) 清水光夫，倉茂英次郎：気象集誌, **12**, No. 3 (1933).
(11) 清石礼造，稲葉俊，富山哲夫：陸水学雑誌, **11**, 137 (1942).
(12) 清石礼造，富山哲夫，小島良夫：日本水産学会年会, 1941年4月.
(13) 富山哲夫，稲葉伝三郎，小島良夫，佐々木定雄：同上.
(14) FARNSTEINER. BUTTENBERG und KORN: Leitfaden fuer die chem. Untersuchung von Abwasser, Verlag Oldenburg (1902).
(15) Standard methods of water analysis, p. 168, 8th edition (1936).
(16) 菅原，小穴，小山，半田，森田，山田：水産研究会報, No. 2, 26 (1949).
(17) LEHMANN: Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt., **44**, 241 (1913).
(18) Kleine Mitteilungen fuer die Mitglieder des Vereins fuer Wasser-, Boden-, und Luft-hygiene, S. 60, 8 Jahrgang (1932).
(19) BACH: Gas und Wasserfach, **72**, 154 (1929).
(20) 富山哲夫：日本農芸化学会誌, 13, 1023 (1937).

海藻の揮發成分に關する化學的研究 第1報
アナアオサ (Ulva pertusa K.) の揮發成分の分劃

片山輝久・富山哲夫
(九州大学農学部水産化学第一教室)

Chemical Studies on Volatile Constituents of Sea Weed
1. The Fractionation of the Volatile Constituents of *Ulva pertusa* K.

TERUHISA KATAYAMA and TETUO TOMIYAMA

No volatile compounds except methyl sulfide have been reported so far *Ulva pertusa* K. The following results have been obtained by fractionating various acidic and neutral compounds contained in the steam-distillate of a large quantity of air-dried Ulva.

1. After several preliminary trials, an appropriate method for the separation of volatile compounds in the steam-distillate has been devised and given in diagram 1.

2. The addition compound of methyl sulfide with bromine showing the same melting point as Haas reported, has been obtained from fraction (2) which does not condense at the steam distillation. At least two carbonyl compounds have been isolated as their respective hydrazones from fraction (2).

3. The existence of several carbonyl compounds have also been confirmed in an ethereal portion (fraction 6) recovered from an ethereal extract of the steam-distillate.

4. From a soap fraction (13), obtained after saponifying the ethereal extract freed from free acid with dilute potassium hydroxide, have been isolated palmitic acid and an odorous unsaturated compound which loses its odour on the catalytic hydrogenation using palladium black.

5. Due to a small yield of free acids soluble in the saturated solution of sodium bicarbonate (fraction 7), only an acid yielding p-bromphenacyl ester having m. p. 124-50°C. has been obtained so far.

6. The fraction of neutral compounds (14) gave on fractional distillation two fractions, one yielding 2, 4-dinitrophenyl hydrazone having m. p. 128°C. and the other, an a bromide showing a gradual decomposition between 174° and 190°C.

海藻の揮発成分については, HEILBRON 氏, 高岡, 安藤両氏, 白浜氏等, HAAS 氏, 小幡. 五十嵐両氏等の研究があるに過ぎない。HEILBRON 氏[1]はヒバマタの一種 (*Fucus vesiculosus*) の不鹸化物を研究して, テルペン化合物の存在を推定し, 高岡. 安藤両氏[2] は忍路産エゾヤハズ (*Dictyoteris devaricata* OKAM.) を水蒸気蒸溜して得た中性油中に, テルペン類の存在を指摘している。また揮発

(昭和25年9月7日受理)

工場廃水の淨化方法に関する研究 —I.

酸添加処理によるアルカリパルプ廃液の除毒方法

河辺克已・富山哲夫
（福岡県福岡水産試験場）　（九大農学部水産化学第一教室）

Studies on Purification of Industrial Waste—I.
Detoxication of alkali pulp waste by an acid treatment

Katsumi KAWABE and Tetuo TOMIYAMA

日本水産学会誌
第二十巻 第八号 別刷
昭和二十九年十二月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 20, No. 8, December. 1954

工場廃水の淨化方法に関する研究—I.

酸添加処理によるアルカリパルプ廃液の除毒方法

河辺克己・富山哲夫
（福岡県福岡水産試験場）（九大農学部水産化学第一教室）

Studies on Purification of Industrial Waste—I.

Detoxication of alkali pulp waste by an acid treatment

Katsumi KAWABE and Tetuo TOMIYAMA

A study has been made of purifying the alkali pulp waste liquor by treatment with chemicals. It has been shown that aluminium sulfate can remove effectively the oxidizable matters with the increase of its concentration. The removal of oxidizable matters can also be achieved without aluminium sulfate by the addition of enough hydrochloric acid as to bring pH of the waste liquor to 4～5 (Fig. 1.). The extent of removal was increased with lowering pH value and raising temperature of the waste liquor (Figs. 3 and 4). In order to estimate the amo int of acid required for purification of the waste, the titration curve has been made (Fig. 2). The determination has also been made of the change in color intensity during the titration with hydrochloric acid (Fig 5).

I. 緒　　言

製紙工場廃水の内で最も毒性が強いと考えられるのはパルプ廃液であつて，この種廃液の毒性については従来次のような研究がある。（1） 流出短繊維が受水区域の底床に沈積して魚類の産卵或いは餌料の場を悪化させ，また同時に沈降堆積する他の有機物質と共に嫌気性細菌の繁殖を助長し，その嫌気的生産物であるメタンガス，炭酸ガスなどが水質を悪化させる[1]，（2） 蒸解の際使用する硫化ソーダが廃液中で種々の形となつて毒性を示す[2)4)]，（3） 特にクラフト並びにアルカリパルプ廃液に含まれる多量の苛性ソーダによつて受水区域の pH が上昇する[2]，（4） 多量の有機物を含有し，その分解に伴つて起る水中溶存酸素の欠乏，硫化水素の二次的発生[1)3)]が起る，（5） 廃液の高度の着色に対する魚類の嫌忌性[3]，更に（6）コロイド物質の主成分と考えられる樹脂酸その他の有機物がもつている一次性毒物[4)5)]，——などが指摘されている。

またこのような毒性を持つ廃液の処理又は廃液中の薬品の回収についての研究も多数行われている。しかし，薬品の回収には設備費に多額の費用を要し，この研究で対象としているような小工場では困難な場合が多く，このような工場では特に簡単な設備と方法とで毒性を除去することが望まれる。そこで効果的な方法として報告されている処理方法の主なものを文献から拾つてみると次のようになる。（1） 廃液を稀釈後空気を吹込んで自然酸化を促進し，或いは更に下水等を混入して好気性細菌の繁殖を助け，廃液の生物化学的酸素要求量を減少させる方法[6)～9)]，（2） 活性珪酸塩或いはこれと硫酸添加を併用した時凝集するコロイド物質を濾過又は沈澱させ，B.O.D.の減少を図る方法[8)～10)]，（3） 石灰，硫酸アルミナ，過塩化鉄，硫酸マグネシウム等の金属塩類を加えた時生ずる凝固物を沈降させ，或いは廃液に酸添加して pH を下げる前処理とこれらを併用する方法[11)～13)]，（4） 直接酸を添加した後長時間沈澱池に放置し，又は濾過する方法[11)12)]，（5） 或いはこれ等の方法を組合せて行う方法——などがある。

1954 年 7 月 2 日受理

これ等の方法が処理の対象としているのは，主として浮游物質並びに多量の有機物質及び硫化物であつて，これ等の減少率から処理効果を判定している。

本研究では福岡県斎藤紙業 K.K. のアルカリパルプ廃液を試料とし，上記の処理方法の二，三を検討し，更に酸添加のみによる処理方法を種々の観点から検討したところ，この方法により最初述べた諸毒性の大部分が除去され，また追つて報告するような一次的有機性毒物の除去も可能な事がわかり，実用化についての可能性も認められたので，その方法並びに結果を報告する。

Ⅱ. 実験結果及び考察

本実験の試料は前記の工場に於て，亜硫酸法で未蒸解のノットを原料とし，加圧アルカリ蒸解した時のパルプ廃液である。その主な分析値を Table 1. に示す。

Table 1. Analytical data of sample tested.

Dry matter	4.42 %
Ash	1.25 %
Oxygen consumed from $KMnO_4$	28,300 cc. 0.1N $KMnO_4$/1.
Iodine consumed	5,200 cc. 0.1N I/1.
Color	Blackish brown
Odour	Terpen-like
pH	>11.5

1. $Al_2(SO_4)_3$ 添加の効果

廃液 100cc. に対し 10 % 硫酸アルミナの添加量を変えた場合，或いは添加量を 8 cc. とし pH を調節した場合について沈澱の分離模様，濾液のヨード消費量をみた結果を Table 2, 3 及び 4 に示した。こゝにヨード消費量は次の如く定量したものである。10 倍稀釈の試水 10 cc を三角コルベンにとり，20 % NaOH 1 cc. 及び 0.1 N ヨード 10 cc. を加えてよく振盪し，室温に 40 分放置した後 10 % KI 1 cc. と 20 % H_2SO_4 1.5 cc. とを加えた時遊離したヨードを 0.1 N ハイポで滴定し，盲検値との差を以てヨード消費量とした。なお，本定量法によるヨード消費量と過マンガン酸カリ消費量とからそれぞれ酸添加処理前後に於ける処理率を計算比較したところ，後者が約 10 % 大であつた。

Table 2. Removal of organic matter by addition of aluminium sulfate.

Sample	10 % $Al_2(SO_4)_3$ 18 H_2O added (cc./100 cc.)	pH	Seperation of precipitate	Filtrate	
				Iodine cons. (cc. 0.1 N Iodine/cc.)	Decrease in oxidizable matter (%)
1	0	11.5	−	5.50	0
2	2	9.2	−	5.42	0.4
3	4	9.0	−	5.00	7.9
4	6	8.4	−	5.10	4.6
5	8	6.8	±	3.08	43.6
6	10	5.4	+	1.47	73.2
7	12	4.8	++	0.97	82.2

Table 3. Effect of pH on removal of organic matter with aluminium sulfate.

Sample	10 % $Al_2(SO_4)_3$ 18 H_2O added (cc./100 cc.)	Acid or alkali added (cc./100 cc.)	pH	Decrease in oxidizable matter (%)	Precipitation
1	8	20 % NaOH 0.4	10.0	44.5	Colloidal
2	8	〃 〃 0.2	8.5	37.6	
3	8	None	6.8	43.8	Jelley-like
4	8	36 % H_2SO_4 0.2	6.2	63.0	Filtrable

Table 4. Effect of adjusting pH on flocculation of organic matter.

Sample	10 % $Al_2(SO_4)_3$ 18 H_2O added (cc./100 cc.)	36 % H_2SO_4 added (cc.)	pH	Precipitation	Sepertion of ppt. after 1 day
1	8	0	6.8	+	−
2	8	0.06	6.7	++	−
3	8	0.12	6.5	++	+
4	8	0.18	6.3	++	+
5	8	0.24	6.2	++	+
6	8	0.30	6.0	++	+
7	8	0.40	5.4	++	+

Table 2～4の結果から判るように，$Al_2(SO_4)_3$ 添加或いは $Al_2(SO_4)_3$ 添加後に酸を加えてpH 7以下に下げると，多量の沈澱を生じ有機物の除去率は大であり，その沈澱の分離はpHが降る程よかつた。また $Al_2(SO_4)_3$ の代りに $FeCl_3$ を試みても同様の沈澱が得られ，$Al_2(SO_4)_3$ と併用してみたが沈降速度に大きい影響がなかつた。また沈澱の沈降を促進するため石灰の添加等も試みたが，室温では著るしい効果はみられなかつた。

2. 酸添加のみによる pH 調整の効果

実験1の結果をみると，$Al_2(SO_4)_3$ 添加後 pH を下げると多量の有機物を吸着した沈澱が得られるが，その沈澱はゼリー状であるために沈降や濾過が遅く，また薬品の所要量を考慮すると工業的には成立し難い。依つて，$Al_2(SO_4)_3$ を用いることなく試料の pH を調整するのみでどの程度有機物を沈澱しえられるかにつき吟味してみた。

（1） 濾液のヨード消費量の減少

酸を添加するのみでも $Al_2(SO_4)_3$ 添加の場合と同様の沈澱が得られ，Fig. 1に示すようにその濾液のヨード消費量もpHの降下と共に低くなり，充分の効果が認められる。しかしpH 5.5 以上ではゼリー状沈澱の濾過が困難であつた。他方pH 4.5 附近から更にpHを下げても処理率の上昇は僅かであつた。

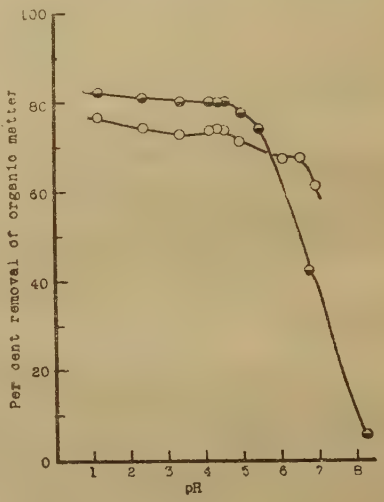


Fig. 1. Decrease in organic matter of the filtrate due to acid-treatment. At room temperature, ◐, and at 100°C, ○,

（2） 滴定曲線

次に，pH降下に要する酸の添加量をみる為に酸による滴定曲線を求めた。Fig. 2でわかるよ

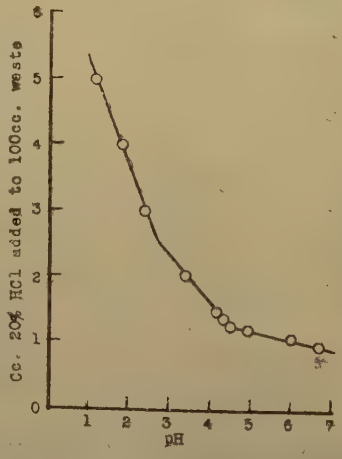


Fig. 2. Titration curve of the waste with hydrochloric acid.

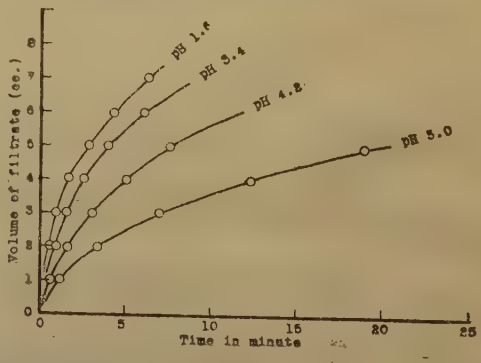


Fig. 3. Changes in rate of filtration due to adjustment of pH of the treated waste. The filtration was carried out at room temperature with filter paper, total volume of the waste being 10 cc.

にpH 7から5までは緩衝能は比較的小であるのに対しpH 4.5 より低い範囲にはかなり強い緩衝能がみられた。従つて処理率を向上させるに必要な酸の経済的添加量はpHを4.5にするための必要量とすべきである

（3） pHと濾過速度との関係原廃液の 10cc. に 20% HClの種々の量を加えpHを 5.8, 5.0, 4.2, 3.4, 1.6 に夫々調整してよく振盪し，沈澱を完全にしてから直ちに同質の円型濾紙で濾し，それぞれの濾過速度を測定した。Fig. 3に示すようにpHを下げると共に濾過速度は著るしく上昇した。いま処理試料を 50 %（5cc.）濾過するに要する時間の逆数により濾過速度比を求めてみるとpH 5.0の時を1とすればpH 4.2, 3.4, 1.6で夫々2.6, 4.9, 7.0となり，他方pH 5.8 では濾過困難であった。

（4） pH と濾液の色との関係

種々の pH で処理した時，その濾液の色は処理時のpHが降下するにつれて淡くなり，pH 2.5 迄は赤褐色から次第に淡黄色に変化し pH 2.5 以下では呈色はあまり減少しなかつた（Fig. 4）。この傾向は濾液のヨード消費量の傾向と似ているが，色の変化程にはヨード消費量の変化はみられないし，また低いpHで処理した濾液にアルカリを加えて再び pH をあげると褐色味を帯びてくることから見て，pH により呈色を異にする多価フェノールの着色も含まれていることがわかる。

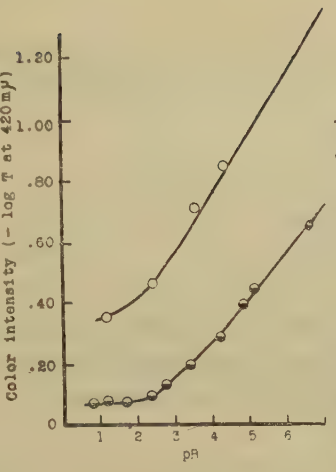


Fig. 4. Change in color intensity of the filtrate by changing pH in the acid-treatmet. At room temperatur ◐; at 100°c.,○

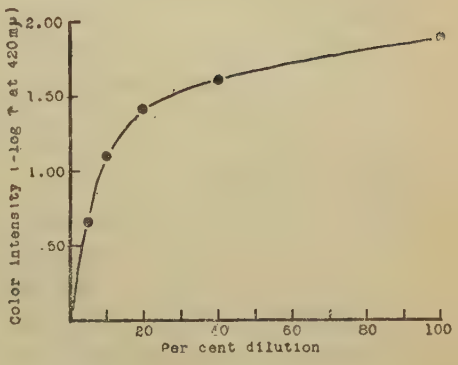


Fig. 5. The relation between intensity (−log T) and dilution of the waste.

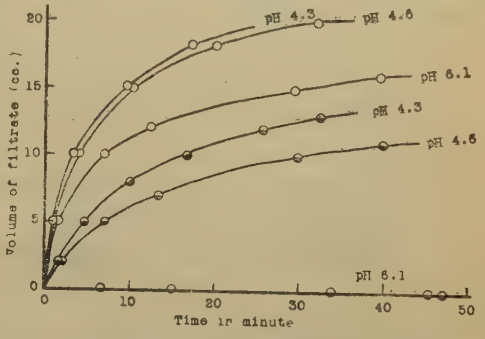


Fig. 6. Changes in rate of filtration depending on difference in temperature and pH. At room temperature, ◒; at 100°C. ○.

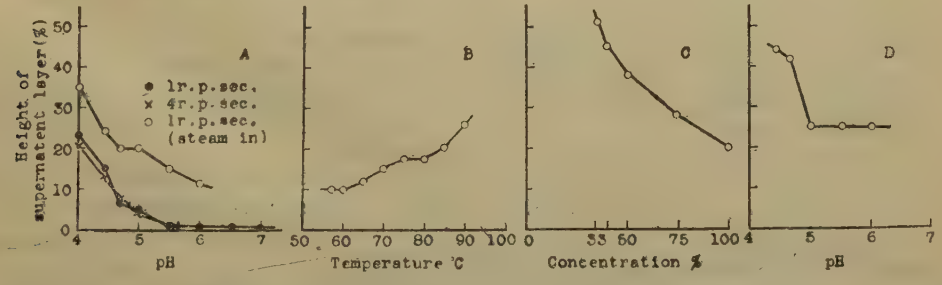


Fig. 7. Change in rate of sedimentation with variation of pH, temperature, agitation and concentration of sample waste. A : Effect of pH and agitation. B : Effect of steaming after treating at room temp. and pH 4.6. C : Effect of variation of concentration at pH 4.5～5.0 and 80°C. D : Effect of passing live steam for 1 min. after treating at varying pH and 65°C(3-tims diluted sample).

なお Fig. 5は濾液の色度を原廃液の色度と比較するために，原廃液の稀釈倍率と 420 $m\mu$ に於ける Optical dencity との関係をみたものである。これを Fig. 4 と対照すると，pH 5，4及び3の濾液の呈色は原廃液の呈色のそれぞれ2.7％，2％及び1％に減少していることがわかる。

3. 酸添加の際に於ける加熱の影響

前実験から pH を下げると有機物の沈降並びに濾過速度，濾液の呈色などの点で好結果を得たが，pH をあまり下げずに沈澱を完全にし，しかも濾過速度を上げることが望ましい。依つて温度を上昇した場合の効果を検討した。

酸添加の際に廃液を予め沸騰水中で温めるか或いは添加後沸騰水中で振盪攪拌することを試みたところ，常温処理の場合にゼリー状を呈した沈澱が粒状の粘性の少い沈澱となり，濾過速度も飛躍的に上昇した。(Fig. 6)。たゞ，Fig. 1及び4に示すように加熱した場合には有機物の処理率が7～8％低く，濾液の色も多少濃いが，これらは別に報告する毒性試験の結果からみると無視することができる。

4. 沈降速度についての二，三の実験結果

酸添加時の pH，温度，攪拌速度及び試料の濃度を変えた場合に於ける沈澱の沈降速度の変化を 500 cc. ビーカーで処理試験を行つた結果は Fig. 7 のようであつた。これによると沈降速度に対しては，(1) pH を低下した場合の効果は著るしいが，攪拌速度を変化した場合の効果は殆んどなく，(2) pH 4.6 では蒸気を通じて温度を上昇する程効果は大きく，(3) 廃液の濃度が小さい程速度が大となるが，稀釈倍率程の上昇はなく，(4) 蒸気を通ずる効果は pH 5 以下で急激に大となることが明かとなつた。

Ⅲ. 要　　約

1. 有機物の大部分は硫酸アルミナの添加により除かれる。この場合 pH が低い程，沈降並びに濾過速度は大きい。

2. 酸のみを添加し pH を 4.5～5.0 とすれば，約 80 % の有機物を除去できる。この場合加熱すれば沈降並びに濾過速度が著るしく上昇する。

3. 廃液の中和滴定曲線を求めた結果では，pH 7 より pH 5 迄の緩衝能は pH 4.5 以下のそれより小であつた。

本研究は福岡県の委託研究費により実施したので，こゝに謝意を表する。

Ⅳ. 文　　献

1) 柴田三郎：高知市周辺及伊野町周辺の産業廃水と公共水汚濁に関する調査報告，高知県水産課，(1954).
2) 柴田三郎訳：工業廃水処理，コロナ社刊，(1949)，PP. 189～205.
3) H. W. Gehm : Forest Product Research Soc., Preprint No. **195**, **6**, (1952).
4) W. M. Van Horn, J. Anderson, and Max Kutz : Inst. of Paper Chem., Appleton, Wis., *Tappi* **33**, 209～12, (1952).
5) H. Jänefelt : *Finnish Timber J.*, **21**, 686～92, (1939).
6) K. G. Trobeck : *Pulp* and *Paper Mag. Can.*, **53**, No. 3, 225～9, (1952).
7) E. N. Hermers, J. D. Frame, and C. N. Sawyer : *Sewage and Industrial Waste*, **24**, 496～507, (1952).
8) H. H. Gehm : *Sewage Works J.*, **19**, 827～9, (1947).
9) W. A. Noggio and H. W. Gehm : *Sewage* and *Ind. Waste*, **25**, 305～10, (1953).
10) R C. Merril : *Ind. Eng. Chem.*, **40**, 1355～9, (1948).
11) W. W. Hodge and P. F. Morgan : *Sewage Works J.*, **19**, 830～62. (1947).
12) M. Chene, C. Deissenberg, and N. Lion : *Ann. Inst. Polytech.*, *Genoble*, 45～53, (1952).
13) C. R. Harihara Iyer, R. Rajagoplan, and S. C. Pillai : *Science* and *Culture*, **17**, 382～3, (1952).

工場廃水の淨化方法に関する研究—Ⅱ.

アルカリパルプ廃液淨化の中間工業試験

河辺 克己・富山哲夫
(福岡県福岡水産試験場)(九大農学部水産化学第一教室)

Studies on Purification of Industrial Waste—Ⅱ.
A pilot experiment for the treatment of alkali pulp-waste liquor

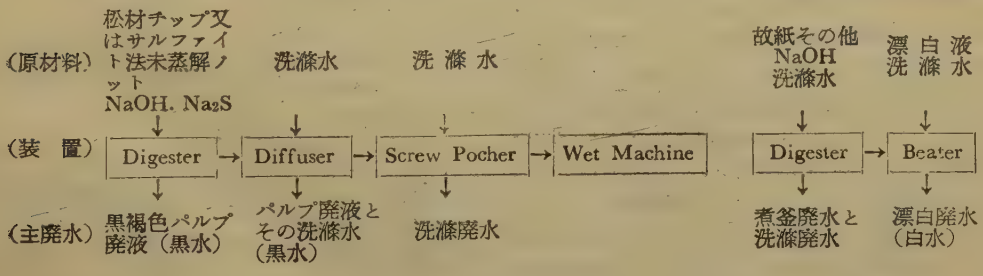
Katsumi KAWABE and Tetuo TOMIYAMA

Using a barrel of 70 liters capacity, the acid treatment of the waste liquor has been carried out with promising results. It has been observed that passing live steam into the waste was effective to both sedimentation and filtration of the flocculum formed. It is to be noted that the thick washing waste (Bé. 7~5) was found to be able to reuse with good advantage for digesting straw and the used paper. In this way the amount of hydroochloric acid was as much reduced as by 60 per cent. It has also been noticed that the original waste can be used for conglomerating briquet and that the precipitate obtained on the acid treatment can safely be used as boiler-fuel since its sulfur content amounts to less than 1 per cent on dry basis.

Ⅰ. 緒 言

第一報に於て得た室内実験結果に基き，その実施の前段階として昭和 28 年 12 月，福岡県齊藤紙業KKの協力を得て同工場廃液の淨化試験を行ったのでその結果を報告する。なお同工場のパルプ並びに故紙その他からの回収パルプの製造工程及びこれに附随した原材料並びに主な廃水の系統を次に示す。

A. パルプ製造工程　　B. 故紙，藁の煮釜関係



Ⅱ. パルプ廃液の処理

1. 実験試料及び装置： この工場ではパルプ原料として赤松チップとサルファイト法に於ける未蒸解部（ノットカス）を使用し，これを加圧アルカリ蒸解している。従つてその廃液も二種あるわけで，いま便宜上チップ及びノットカスを各原料とする廃液をそれぞれ Chips plup waste 及び Knot-pulp waste とする。これらの廃液並びに前報の試料の分析結果は Table 1 に示すようになる。前報の試料はノットカスを原料としてをり，本報の試料より薄かつたと思われるが本質的な差はない。また本報の試料は何れも Diffuser から排出直後のもので洗滌水は含まれていない。実験には一個の試料について三個の四斗樽を用意し，その

1954 年 7 月 2 日受理

Table 1. Samples used in this study

Sample	pH	free alkali	Iodine consumed	Dry matter
1	11.5	0.051 N	5.2	4.4 %
2	>13	0.257 N	16.2	12.2 %
3	>13	0.454 N	32.0	17.4 %

中一個は直径約5糎の穴を底に穿ち，小石，莚の上に鋸屑を約5糎の厚さに敷いて濾過槽として使用し，他の二個は夫々酸添加処理槽並びに濾液溜として使用した。

2. 実験結果及び考察： 前報の実験結果から得た，pH 4.5～5.0 で熱時に酸添加処理する条件を採用し，第二表以下に示すような結果を得た。なお酸としては塩酸を約 20 % に薄めて使用した。

a. ヨード消費量の減少： 前記試料を液温が下らないうちに棒で攪拌しつゝ約 20 % の塩酸を徐々に加えると，土色の多量の沈澱を得る。その濾液と原廃液とについて前報の方法でヨード消費量の定量を行い，Table 2 のような結果を得た。この結果から室内実験の結果とほゞ同程度の有機物処理効果が期待できる。

Table 2. Removal of organic matter by treatment with acid, followed by filtration with 5 cm of saw-dust layer.

Sample		Treatment pH	Treatment Temp.	Decrease in organic matter as expressed by Iodine consumed: cc. 0.1 N I/cc. waste or treated waste	Decrease in Iodine cons.	Turbidity of filtrate
Knot-pulp waste	non-treated			16.20		
	treated	5.0	75 °C	4.07	74.8 %	—
		4.5	40	3.88	76.2	—
Chips-pulp waste	non-treated			31.20		
	treated	4.5	78	4.85	74.4	±
		5.0	78	4.58	85.3	±
		4.8	78	4.58	85.3	±
〃	non-treated			32.80		
	treated	4.3	78	8.65	73.8	±
		4.3	78	6.25	81.0	±
		4.3	78	6.78	79.4	±

b. 酸添加処理廃液の濾過速度： 濾過速度は濾床の状態と沈澱粒子の状態に主として左右されると考えられるが，濾床は工場内で手に入り易く安価なこと，沈澱自身が濾床になること及び濾過後の残渣の利用をも考慮して，鋸屑の濾床を使用した。沈澱粒子の状態は第一報に報告したように pH，加熱温度によって変るが，本実験では更に生蒸気吹込みの効果並びに濾過時に於ける攪拌の効果についても，二，三の実験を行つた。その結果は Fig 1 に示す通りで，この図から次のことがいえる。

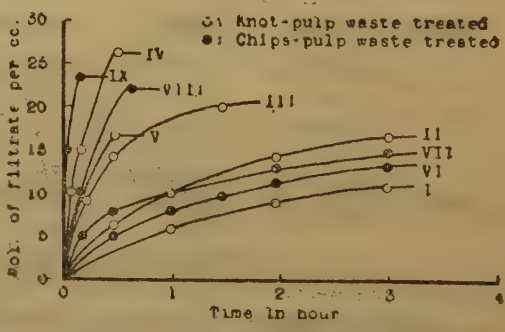


Fig. 1. Velocity of filtration.
Legend for Curves: —I: pH 4.5, temp. 42° C; II: pH 5.0, temp. 78°; III: pH 4.5, temp. 68°; IV: pH 4.5, temp. 85°, with live steam; V: pH 5.4, temp. 78°, filtered by residue of I; VI: pH 4.8, temp. 70°; VII: pH 4.5, temp. 78°; IX: pH 4.5, temp. 78°.

(1) Knot pulp waste では，pH 4.5～5.0 に於て 42°C, 78°C, 85°C (78°C で酸添加後生蒸気を吹込んだもの) で酸添加処理した場合，温度が高い程濾過速度は大となる。なおこの場合見掛けの沈澱量は逆に少くなる。(2) 処理温度は低くても (68°C) 常に攪拌しつゝ濾過すれば濾過速度は増す。(3) pH 4.5, 75°C で処理し更に生蒸気を通じて 85°C に 3 分間保つたものでは，上記濾床で約 30 分で濾過を終り，更に同一方法で処理したものを此の上に加えた場合，やは

り 30 分で濾過を終った。同様三回目も約 40 分をを要するのみであつた。なお処理廃液の最初の高さは 41 糎であり，この時できた沈澱の厚さは約 32 糎，上部空間は 9 糎であつた。(4) Chips-pulp waste の場合は同一処理法では Knot-pulp waste より濾過速度は大きい（pH 4.5～5.0, 78°C)。

c. 沈降速度： 実際上沈澱の分離は濾過するより沈降させてその上澄液を除く方が操作並びに装置の点で簡単なのでこの実験を行つた。Table 3 は現場に於ける二，三の実験結果を示す。この結果によれば，

Table 3. Rate of sedimentation after acid treatment.

Sample	Treatment		Depth of supernatent as per cent of height of treated waste after leaving for 1 hr.	
	Temp. °C	pH	Without steaming	Live steam passed for warming to 85 °C.
Knot-pulp waste	75	4.8	36	75
	75	4.5	30	64
	75	4.5	30	54
	60	4.7	40	77
Chips-pulp waste	50	4.5	—	
	60	4.5	53	
	70	4.5	57	
	80	4.5	93	

Knot-pulp waste の場合には排出時の温度（70 °C 附近）では 30 % 前後，更に 85 °C になるまで生蒸気を吹込めば約 70 % の上澄液を分離し得る。また Chips-pulp wast の場合には生蒸気を通じなくても 70°C で約 60 %，80 °C では約 90 % の上澄液を得た。なお，何れの場合も放置時間一時間で大部分の沈降を終つた。

Ⅲ. パルプ廃液並びに処理残渣の利用

a. パルプ廃液の故紙蒸解仕込液としての利用：故紙及び藁のアルカリ煮釜に仕込む液のアルカリ濃度とパルプ廃液のそれとが似ている事，及び廃液が表面活性に富む事などからみて，パルプ廃液が煮釜に使用できると思われるので Knot-pulp waste を仕込液として故紙の蒸解試験を行つた。ドラム罐を利用し，常法の如く二時間生蒸気を通じた後一夜放置したが，その墨抜き効果は良好だつた。

次に，現在の煮釜並びにこの試験釜の仕込液及び蒸解終了時の廃液についての分析値を Table 4 及び 5

Table 4. Change in free alkalinity of alkaline solution before and after digesting straw and used paper.

Sample		pH	Free alkalinity N	Iodine consumed cc. 0.1 n/cc.	Total amount of free alkali %
Used paper	before	>13	0.22		100.0
	after	12.5	0.07	1.38	39.2
Straw	before	>13	0.33		100.0
	after	>13	0.13	3.51	49.1

Table 5. Digestion of used paper with alkali-pulp waste.

Sample		Iodine-cons. cc. 0.1N I/cc.	Free alkalinity	Density (Baumé)
pulp waste	before	13.3 (100 %)	0.26 N (100 %)	1.054 (7.2)
	after	7.6 (57 %)	0.04 N (17 %)	1.031 (4.2)

に示す。Table 5 の結果では Table 4 に比べ蒸解時のアルカリ濃度の減少率が大きいが，これはヨード消費量の値からも判るようにドレーンにより約 2 倍に薄まつたことによるもので，その減少率は何れの場合もほゞ同様と考えられる。從つてパルプ廃液をこの工程に利用した後にその廃液を酸添加処理すれば，苛性ソ

ーダの節約になると共に処理に要する酸の量はこの工程を通さず直ちに処理する場合に比べて約 60 % 節約できることになる。

b. 原廃液並びに沈澱残渣の利用： Van Horn[2] によれば亜硫酸パルプ廃液に石灰添加した時できる残渣は，彫塑材料，バニリン抽出の原料に使用でき，廃液自身も道路舗装材，煉炭粘結材，アルコール原料，燃料，飼料酵母の製造原料，エチルバニレートの回収，食品防腐剤，殺虫剤，石鹸，肥料等に利用の道があることを報告している。本報ではパルプ廃液の積極的利用によつて，処理の対象となる廃液量を減少するため，上記の故紙蒸解への利用法の外，濃厚廃液を煉炭の粘結剤として使用を試みた結果，充分役立つことが確かめられた。

次に，酸添加処理の際 Knot 及び Chips-pulp waste から夫々 120 kg/m³ 及び 60 kg/m³ の沈澱ができるが，これを鋸屑と混和して戸外に放置乾燥し，石炭と共に釜口で燃した結果よく燃えることが認められた。燃料としての条件はいろいろあるが，特に燃料中に硫化物が存在すると燃焼中に亜硫酸ガスが発生して釜を痛める惧れがあるので，原廃液並びにその処理残渣について Denis-Benedict の方法[3] で硫黄を定量したところ，次の結果を得た。即ち，Knot-pulp waste 及び Chips pulp waste の各蒸発残渣では 1.53 % 及び 0.93 % であつたが，これ等廃液の処理残渣の乾燥試料では何れも 0.42 % であつた。工業用炭では硫黄含量として 1% 以下が求められているので，処理残渣を燃料として使用することはこの点では差支えないと考えられる。

その他追つて報告するような毒物の抽出等も考えられるが，これは今後の研究に俟つことにしたい。

Ⅳ. 総　括

1. 第一報の結論に基き，現場で四斗樽の規模における処理試験を行い，第一報の結果が大規模に応用できる可能性を確かめた。その際生蒸気を通ずることが沈澱の濾過，沈降に有効な事がわかつた。
2. パルプ廃液を故紙蒸解の仕込液として使用できることが判つた。この工程に利用した後に酸添加処理すれば，そのまゝ処理する時の所要塩酸の約 60 % を節約できる。
3. 濃厚廃液は煉炭の粘結剤として利用しえられるが，その処理残渣は燃料にも使用できることを確かめた。

本研究は齊藤紙業 K.K. の協力並びに福岡県水産部よりの委託研究費により遂行することができた。依てこゝに深謝の意を表したい。

Ⅴ. 文　献

1) 河辺克己，富山哲夫：工場廃水の浄化方法に関する研究 I，日水会誌.，20，700 (1954).
2) W. W. Van Horn: *Trans. Wisconsin Acad. Sci.*, **39**, 110 (1949).
3) Denis: *J. Biol. Chem.*, **8**, 401 (1910).

博多湾の海藻についての二三知見

瀬川宗吉・太田国光

Notes on some seaweeds of Hakata Bay

Sokichi Segawa and Kunimitsu Ohta

九州大學農學部學藝雜誌 第十三卷 別刷
Reprinted from the Science Bulletin, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Vol. 13, Nos. 1~4, November, 1951

IV. 総　　括

以上の結果を綜合すれば，用いた5品種中，日田営林署管内アヤスギが本地方に於ては挿木の活着成績は最もよく山出苗として最も期待し得る品種である．飫肥産メアサが実質的にも相対的にも著しく不良の成績を示したことは如何なる理由によるものか一応再吟味の要がある．一般にスギの挿木に於ては品種によつて発根能力に著しく差異があることは明かである．而して発根率の大なものは山出率も概ね大でカルスの形成度合は小となる傾向を示す．但し一部にはこの考えは満足されない場合がある．即ち発根しても根の発達程度が品種によつては同一傾向を示さないものがある．又これらのことと生存率との間に関係は認められない．即ち何れの品種も生存率については 95 % 以上の好成績を示したからである．

引 用 文 献

1） 片山茂樹・東　鶴人 ： 北九州産各種スギの1年生挿穂苗の発根状態に就て， 日本林学会春季大会講演集（1941）.

2） 榎本善夫 ： 挿スギに見られた根及び癒傷組織発達の林業品種による差異に就て， 東大演習林報告，No. 37（1949）.

3） 石崎厚美・長友安男 ： 九州に於ける杉品種に関する研究（No.1），日本林学会九州支部第3回例会抄録（1950）.

Résumé

For the purpose of study on the relation between the races of *Cryptomeria japonica* and their root-formation in the cuttings, the races : Measa, Kurojin, Misugi, Ayasugi and Yabukuguri were used as experimental materials. The results are as follows ;

（1） The differences of root-formation were remakable and were about 42–92 % among the races mentioned above.

（2） Comparing the rates of the rooting and the field run stock, Ayasugi shown the heighest in all races. While Yabukuguri was comparatively high in rate of the rooting but low in rate of the field run stock, in the case of Measa the reversed results were seen in both respects.

（3） Relation between root and callus formation usually shown reversed results.

（4） Survival rate was above 95 % in all of races used.

博多湾の海藻についての二三知見*

瀬川宗吉・太田国光

Notes on some seaweeds of Hakata Bay

Sokichi Segawa and Kunimitsu Ohta

博多湾の海藻に関しては，従来あまり学界に報告されて居らない．瀬川によつて，先年（1949）海藻群落の概略と所産海藻の目録が発表されたが，これは一般に対する簡単なる紹介であつて特別の知見を披瀝したものではない．太田は博多湾海産植物の分布に関して先般来調査に専念しているが，報告を要する種類並に事実が我々の研究によつて幾つかわかつて来たので，次にその一部を予報する次第である．

（1） フシナシミドロ属の海産種

この綠藻属は我国では従来淡水産種のみ知られていて海産種はあまりはつきり知られていなかつた．例へば淡水産種として東（1916）は7種1変種，岡田（1939）は4種を報じている程度である．ところが欧州では淡水産ばかりでなく，数種の海産種が知られている．今回の調査でこの属の一種が博多湾々奥の名島-妙見島に見出されたことは興味深い．その棲地は海水の自由に出入する古釣堀ともみられる池であつて，底の泥地にマツト状に叢生していた．冬季開現はれ春季には消失した．その形態を記述すれば次の如くである．

糸状体は錯綜し，軟かく，高さ 2—4 cm，直径 30—60 μ，隔壁及び特別なる縊れなく，所々で分岐する．雌雄異株？　生卵器は糸状体の先端又は短枝の先端に生じ，卵形，長さ 130—180 μ，幅 100—140 μ，柄状部は極めて長く 200—400 μ，特別の屈曲を示さない．藏精器は糸状体の先端又は短枝から変成，円柱状稀に分岐し，特別の屈曲を示さず，長さ 250—500 μ，稀に 1000 μ に達し，幅は 90 μ に達する．開口は多数で嘴状突起となる．柄細胞を有し，長さ 35—70 μ，時に 120 μ に達し，幅 35—50 μ．

次に種類の査定であるが，この属では有性生殖器官に関係する形質が分類の基準とされている．藏精器が柄細胞をもつ海産種には *V. synandra* Woron., *V. coronata* Nordst., *V. sphaerospora* Nordst., *V. intermedia* Nordst., *V. litorea* Bag. et Ag. 及び *V. piloboloides* Thuret の6種が知られているが，このうち *V. synandra* は androphore をもつていて非常に異る種であり，*V. coronata*, *V. sphaerospora*, *V. intermedia*, *V. piloboloides* は雌雄同様で何れも藏精器と生卵器が相接して作られるので，この種類の様に相離れて出来るものとは異る．残る *V. litorea* に最も近いと思はれるが生卵器の柄

* 九大農学部水産学教室及水産実験所業績．文部省科学研究費による研究の一部．

が眞直であつて鈎狀に曲つていない点で必ずしも一致しない．その他糸狀体が細く，生卵器も小造りであり，藏精器が稀に分岐することなどの差異が見出される．

そこで *V. litorea* に近い新種と考へられるのであるが，尙檢討中である．和名にウミフシナシミドロと命名した．これで我国暖海産海藻フローラにたしかな *Vaucheria* 属を加へたことになる．

（2） フトモヅク属の一新種

フトモズク属 *Tinocladia* は Kylin（1940）によつて創設された属であつて，日本のフトモヅク，即ち従来 *Eudesme crassa* と云はれて来た褐藻を type species としたものである．その近似群と異る処は皮層の同化糸が不分岐であり，且，皮層と髄との間に緩く結合した細胞糸の明瞭なる皮下層（subcortex）をもつていることである．Kylinは 属の創設と同時にフトモヅクの他に4種を挙げているが，今回博多湾から一未記載種を採集することが出来たので次にこれを記述する．

体は多く叢生，單條又は多少分岐，高さ8—15 cm，長棍棒狀，普通上部が段々太くなり 13 mm 位までになる．髄は髄糸の集合から成るが，体の太さに比して甚しく細く，径約 350 μ，その細胞は長さ約 90 μ，径約 15 μ．皮層の同化糸は甚しく長く，2 mm の長さに達するものもある．同化糸の細胞は下部で長さ約 20 μ，径約 18 μ．先端になる程細まる（約 7 μ）．中軸から出て略々水平に伸び，所々で分岐した緩く結合した細胞糸の皮下層は甚しく厚く，数 mm にも達し，その細胞は径 6—16 μ，髄に近づく程長くなり 100 μ に達する．單子嚢は長卵形，同化糸の基部に作られるが，その大さは 45—90 × 30—60 μ 位である．

Kylin の挙げたこの属の5種は何れも普通に分岐するもので，この種の様に單條のものはない．未記載種と思はれるので *Tinocladia simplex* Segawa et Ohta の新学名並にその外形からキツネノヲと云ふ和名を用意している．この褐藻は名島一妙見島の岩礁の西北よりの二つの潮溜に見付けられた．冬季繁生し，3—4月にかけて急に凋落した*．

（3） イトフノリについて

イトフノリは岡村（1914）によつて詳しく紹介された紅藻であるが，その学名として大西洋の *Gloiosiphonia capillaris* (Huds.) Carmichael をあてられた．その後我国の海藻研究者は，そのままこの学名を使用して現在に到つている．ところが博多湾及附近のイトフノリの材料について，その procarp の発達を追究して見たところ，少くともこの材料は *G. capillaris* にあてることが不可であることが明かとなつた．

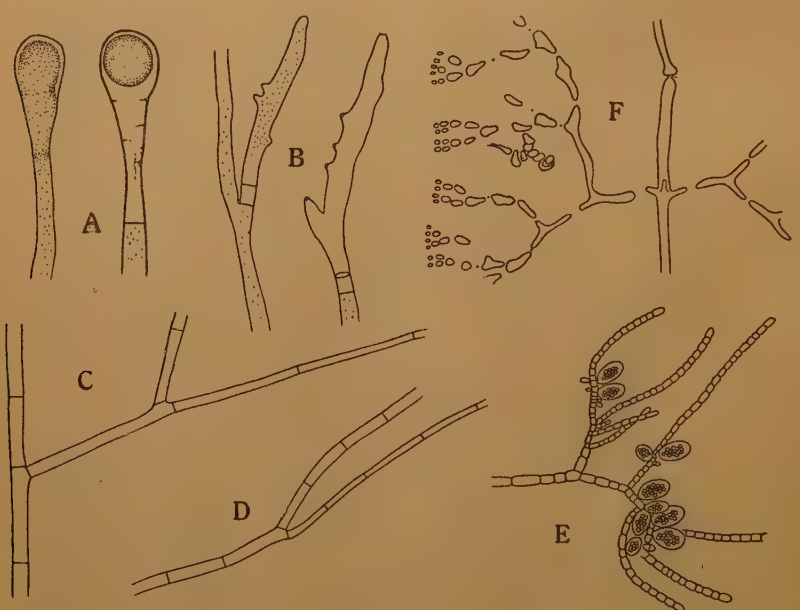
大西洋の材料について，その procarp の発達を研究したのは，Oltmanns（1898），Sjöstedt（1926），Kylin（1930）等である．これら研究者の結果を綜合すると次の様になる．（1）procarpial branch は1—2個細胞から或る柄をもつてその支持細胞に附着すること．（2）その柄の先に1（稀に2）個の造果糸及び1個の助細胞糸を着けること．

* 以上の (1)，(2) の二件については太田（1951. 5. 26. 於鹿兒島）によつて日本植物学会九州支部第1回大会で講演された．

（3）造果糸は3個細胞から成ること．（4）hypogynous cell は特に甚しく膨れ，且その内容は豊富であること．（5）助細胞糸は7—8個細胞から成ること．（6）助細胞は介在し，大体5番目のものが助細胞に変成すること．（7）助細胞は特に大きく，これより先の細胞は特に小形となり，助細胞のところで甚しく曲るので助細胞糸は釣針状となること．（8）時として柄，稀に造果糸，極めて普通に助細胞糸から1—数個細胞の細胞糸が副出すること．

以上の諸性質は岡村（1914）及我々の材料での研究の結果と殆ど一致する．しかし只一つ注目すべき差異が見出される．それは procarp の支持細胞の位置であつて，大西洋のものは中軸から出る細胞糸の最初の細胞に極限されるに対し，日本産の材料では大体3番目位の細胞が支持細胞となる．その結果嚢果の結ばれる位置も大西洋産のものでは中軸に接した内部である（Bornet et Thuret, 1876; Newton, 1931, etc.）に対し，この材料では表皮に近く形成される．岡村（1914）の材料の産地は不明であるが，この点大体我々の観察と一致する．

そこで我々の材料としたイトフノリは大西洋のものとは種が異るのではないかと云ふ疑問がおこつて来る．そのつもりで見ると外形も相当違ふ様である．大西洋産のものは多く小柄で主軸に生ずる枝が小造りであるが，我々の材料では軸から幾らかの強力な枝が生じ，これに小造りの小枝が生じている．即ち大分大柄に出来ている．



第　1　図．

A, B.　ウミフシナシミドロ *Vaucheria* sp. × 60
A. 生卵器，B. 蔵精器．

C, D, E.　キツネノヲ *Tinocladia simplex*. × 50
C. 髄絲と皮下層細胞絲の下部，D. 皮下層細胞絲の中部，
E. 皮層絲と單子嚢．

F.　イトフノリ．× 160
F. procarp の位置を示す体の縦断図．

この属には従来 *G. capillaris* の他に北米 California から *G. verticillaris* Farlow 及び *G. californica* (Farl.) J. Ag. が知られている．前者は軸に小枝が輪生するのでこの材料とは区別出来るが，*G. californica* との異同は差当り研究を要する．尚本邦各地から採集した筆者ら所蔵のいわゆるイトフノリの標本中には，小枝の輪生する "Miyako, IV, 1935, K. Segawa" なる標本があり，又表日本のものと日本海北部のものとの大さに甚しい差異があつたりして，いわゆるイトフノリは2—3種混同したものではないかとの疑問がおこつて来る．この想定のもとに procarp 等の研究を進行中である．とにかく博多湾及び附近のイトフノリは *G. capillaris* にあてるべきではないと思ふ．

研究上種々便宜をいたゞいた内田惠太郎教授に感謝の意を表する．

引用文献

Bornet, E. et Thuret, G. (1876), Notes algologiques, I–II.

東道太郎 (1916), 淡水藻類 (岡村：日本藻類名彙).

Kylin, H. (1930), Über die Entwicklungsgeschichte der Florideen, Lunds Univ. Arsskr. N. F. II, 26–6.

—— (1940), Die Phaeophyceenordnung Chordariales, Lunds Univ. Arsskr. N. F. II, 36–9.

Newton, L. (1931), A handbook of the British seaweeds.

岡田喜一 (1939), 淡水藻類 (日本隠花植物図鑑).

岡村金太郎 (1914), 日本藻類図譜, vol. 3, no. 5.

Oltmanns, F. (1898), Beiträge zur Entwickelungsgeschichte der Florideen, Bot. Zeit, 56–1.

瀬川宗吉 (1949), 海藻 (「福岡」p. 23–26).

Sjöstedt, L. G. (1926), Floridean studies, Lunds Univ. Arsskr. N. F. II, 22–4.

Résumé

In this preliminary report the writers treated the following noteworthy seaweeds collected in Hakata Bay.

1) A probably new species of the genus *Vaucheria* was collected in this bay. This is the first time that this genus has been found in Japanese sea water.

2) A new species of the genus *Tinocladia* was collected in this bay. The species differs from the other species in having a simplex frond. A new name, *Tinocladia simplex* Segawa et Ohta, has been provided.

3) Using the materials of this bay the procarp development of the so-called *Gloiosiphonia capillaris* has been studied. In the European materials of *G. capillaris* the procarpial branch arises from the basal cell of a lateral branch, while in the writers' materials it arises from the infracortical cell. The difference seems so important that it is difficult to identify the writers' specimen with *G. capillaris* of Europe.

Fisheries Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University

カサゴの発音機構について*

道津喜衛

On the sound producing mechanism of a scorpaenoid fish, *Sebastiscus marmoratus*

Yosie Dotu

緒言

今迄に鰾によつて発音する多くの種類の魚が知られてゐるが，生きて発音してゐる体内部の狀態の観察は，あまりないやうである．筆者は，カサゴ *Sebastiscus marmoratus* Cuvier et Valencinnes を生きたまま解剖して，発音時に於ける鰾の狀態の変化を観察し，併せてその内部及び外部形態を見て，カサゴの鰾による発音の機構の大要を知る事が出来た．

材料及び取扱方法

観察の材料としては，1949 年（昭和24年）7月，熊本縣富岡町にある，九州大学附属臨海実験所附近の磯で釣つた雌雄のカサゴの成魚2尾宛を用ひた．これ等のカサゴを生きたるままで水槽から取り出し，その頭部をガーゼで厳つてしつかりと抑へ，メスで左側の腹部筋肉を切り取ると，内臓が露はれるが，この時カサゴはあばれて，鰾を動かし「グウー，グウー」と音を出す．之等材料に用ひた4尾のカサゴはみな同様な音を発した．

鰾の形態

全長 22 c.m. の雄のカサゴについて鰾の構造を見ると，鰾は無鰾管の閉鎖型であり，腹腔の背方前部に位置し，長軸 56 m.m. 短軸 25 m.m. 位の細長い楕円体狀のもので，脊椎骨の直下に略ぼ水平に位置してゐる（Fig. 1）．鰾の壁は内外二重の壁よりなるが，外壁（EW）は白色で厚く，その前端部は頭骨（SK）の後端部に強く附着し，又，その背部前方には，第1（C 1），第2（C 2）及び第5（C 5）脊椎骨と鰾外壁とを連結する白色靱帯（L）が左右夫々 2 対宛計 12 本みられる．

又外壁の背側には，外壁に密着して，後頭外骨に始まり外壁後部背方に終るほぼ水平の長さ 50 m.m., 幅 8 m.m. 位の淡褐色の大きな筋肉（M）が左右に一対ある．この筋肉は鰾外壁を収縮する役をなす．外壁後端には，外壁を通つて内壁に達し，そこに赤腺（R）を作る1本の血管（VR）が外壁に達してゐるのが見られ，また，鰾の後端より前方約 15

---

* 九州大学農学部水産学教室業績．第7回九州大学農学部定期学術発表会で講演，（1949年11月18日）．この研究は文部省科学研究費でなされた（内田恵太郎）．

水産食品の一鮮度測定法

富安 行雄・豊水 正道・高橋喜久雄

A method of freshness determination of aquatic food products

Yukio Tomiyasu, Masamichi Toyomizu and Kikuo Takahashi

九州大学農学部学芸雑誌，第12巻，第4号，別刷
REPRINTED FROM THE SCIENCE BULLETIN OF THE FACULTY
OF AGRICULTURE, KYUSHU UNIVERSITY,
VOL. 12, NO. 4, SEPTEMBER, 1952

水産食品の一鮮度測定法*

富安 行雄・豊水 正道・高橋喜久雄

A method of freshness determination of aquatic food products

Yukio Tomiyasu, Masamichi Toyomizu and Kikuo Takahashi

著者等は腐敗魚の脱臭法を研究中腐敗魚の蒸気蒸溜液を硫酸々性に於て過マンガン酸加里で処理することにより脱臭され，然もこの場合に於ける過マンガン酸加里の必要量は腐敗の進行程度と密接な関係を有することを知つたのでこの方法によつて魚介類の鮮度を測定しようと考えた.

過マンガン酸加里消費量による鮮度測定法に就いては R. Strohecker 等[1](1937) が 10 g の魚肉を蒸気蒸溜してその溜液の中性に於ける過マンガン酸加里消費量を pH 6.17 から 6.60 の魚肉について測定し 100 g 当り 0.1N 過マンガン酸加里溶液を 9.6 cc～99.6 cc を要すると述べている. 又 L. Farber[2](1949) は魚肉の圧搾汁を室温で通気して揮発性還元性物質の過マンガン酸加里消費量を苛性加里アルカリ性に於て測定し鮮魚及び罐詰魚類の腐敗判定に用いた.

著者等は試料を蒸気蒸溜して溜液を 0.1N 過マンガン酸加里溶液に受け，之を硫酸々性となし加熱して充分反応せしめた後当初の過マンガン酸加里溶液と等量の 0.1N 蓚酸溶液を加え過剰の蓚酸を 0.1N 過マンガン酸加里溶液で逆滴定して過マンガン酸加里消費量を測定した. この方法に於て過マンガン酸加里及び硫酸の濃度と加熱時間との関係並びに試料の蒸溜時間等に就て吟味した後各種の魚介類，蒲鉾等について鮮度の低下に伴う過マンガン酸加里消費量の増加を測定した結果之等の一鮮度測定法として利用し得ることを知つたのでその大要を報告する.

実　験　の　部

I. 過マンガン酸加里消費量測定法の吟味

1）過マンガン酸加里及び硫酸の濃度と加熱時間との関係

水の過マンガン酸加里消費量の測定には上水では酸性に於て酸化する Kubel 法が用いられ，塩化物の多い海水・下水等ではアルカリ性に於て酸化する Schulze 法が用いられている. 酸性反応に於ては 50 cc の試水に対し 10 cc の 0.1N 過マンガン酸加里溶液及び 10 cc の硫酸溶液（1：3）を加えて直火で加熱し沸騰し始めたら湯煎上に 15 分間 100° に保つた後逆滴定して測定している[3].

著者等はこの方法に於て腐敗魚肉の蒸気蒸溜液を用いて添加する過マンガン酸加里及び硫酸の量と直火で加熱沸騰後湯煎上で加温するのに要する時間との関係を検討した.

試料としては 100 g のマイワシ（揮発性塩基窒素 38 mg）を蒸気蒸溜して 2.5 *l* の溜液をとりその 100 cc 宛に対して第1表の如く 0.1 N 過マンガン酸加里溶液及び硫酸溶液

---

* 九州大学農学部附属水産実験所業績第6号，

（1：1）を加えて之に数個の予め灼熱せる陶土片を入れアスベスト金網上で加熱し沸騰後直ちに煮沸湯煎上に移し一定時間加温後添加した過マンガン酸加里溶液と等量の 0.1 N 硫酸を加えた後過マンガン酸加里溶液で逆滴定しその滴定値よりブランクの値を控除して過マンガン酸加里消費量* とした.

第 1 表：過マンガン酸加里及び硫酸の添加量と加温時間との関係.

O.IN $KMnO_4$(cc)	15			10			10			10			5		
H_2SO_4 1:1 (cc)	10			10			20			5			10		
加温時間(分) ＼	滴定値	ブランク	$KMnO_4$ 消費量	滴定値	ブランク	$KMnO_4$ 消費量	滴定値	ブランク	$KMnO_4$ 消費量	滴定値	ブランク	$KMnO_4$ 消費量	滴定値	ブランク	$KMnO_4$ 消費量
	(cc)	(cc)	(cc)												
0	0.94	0.28	0.66	0.72	0.16	0.56	1.09	0.51	0.58	0.53	0.11	0.42	0.60	0.08	0.52
5	1.20	0.39	0.81	1.00	0.28	0.72	2.02	1.07	0.95	0.75	0.17	0.58	—	—	—
10	1.45	0.52	0.93	1.29	0.35	0.94	2.36	1.40	0.96	0.88	0.19	0.69	1.06	0.23	0.83
15	1.61	0.67	0.94	1.42	0.49	0.93				0.91	0.20	0.71	—	—	—
20										1.16	0.22	0.94	1.24	0.30	0.94
30													1.29	0.33	0.96

マイワシ（揮発性塩基窒素 38 mg）100 g より 2.5 ℓ の溶液をとり 100 cc 使用.

第1表に示した如く過マンガン酸加里溶液 15 cc・硫酸溶液 10 cc 及び過マンガン酸加里溶液 10 cc・硫酸溶液 10 cc では 10 分間の加温で，過マンガン酸加里溶液 5 cc・硫酸溶液 10 cc 及び過マンガン酸加里溶液 10 cc・硫酸溶液 5 cc では 20 分間の加温で，過マンガン酸加里溶液 10 cc・硫酸溶液 20 cc では 5 分間の加温でそれぞれ略々相等しい一定の過マンガン酸加里消費量を示しそれ以上長く加温しても値は増加しなかつた.

次にグチ（揮発性塩基窒素 30 mg），トビウオ（揮発性塩基窒素 26 mg）及びコノシロ（揮発性塩基窒素 36 mg）を用いて是等の磨砕した 2 g 宛の魚肉を蒸気蒸溜して得た溜液 100 cc に就て上記の条件に於て過マンガン酸加里消費量を測定した．その結果は第 2 表に示した如く上記の実験条件に於ては略々一定の値を示し満足する結果を得た.

第 2 表：各種条件に於ける過マンガン酸加里消費量.

O.IN $KMnO_4$(cc)	15	10	10	10	5
H_2SO_4 1:1 (cc)	10	10	20	5	10
試料 ＼ 加温時間(分)	10	10	5	20	20
	(cc)	(cc)	(cc)	(cc)	(cc)
グチ（揮発性塩基窒素 30 mg）	0.62	0.65	0.62	0.64	0.63
トビウオ（揮発性塩基窒素 26 mg）	0.48	0.47	0.49	0.49	0.51
コノシロ（揮発性塩基窒素 36 mg）	0.67	0.69	0.69	0.70	0.71

試料　2 g.

* 試料 100 g に換算した値を以て過マンガン酸加里消費量とするのが妥当であるが“定量法の吟味”の項に於ては供試料に対する値その儘を記載した.

実際の測定に当つては試薬の添加量の少いこと，加温時間の短いこと並びにブランクの値の小さいことが望ましい．是等の点を考慮して考えると過マンガン酸加里溶液 10 cc・硫酸溶液 10 cc に於ては 10 分間の加温でブランクの値が 0.35 cc であり之が最良の条件と考えられる．

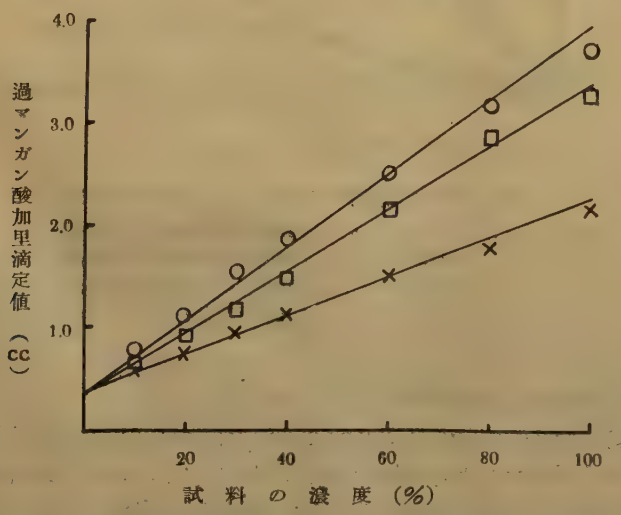
第1表に示した如くブランクの値は過マンガン酸加里及び硫酸の濃度に影響されるので，過マンガン酸加里溶液 10 cc・硫酸溶液 10 cc を加えて 10 分間加温して測定するに当り還元性物質の量が等しくても液量が異れば滴定値に差異の生ずることは当然想像し得るので腐敗したグチ，サバ及びイサキを蒸溜して得た溜液 80 cc に再蒸溜水を加え第3表に示す如く稀釈して液量の差異が過マンガン酸加里滴定値に及ぼす影響を試験した．即ち液量 100 cc に於ては ±5 cc の変異に対し滴定値は平均 ±0.03 cc の差異を生ずる故測定に当つては溜液量を正確に一定量とる必要がある．

第3表：液量の差異による過マンガン酸酸加里滴定値の変化．

液量(cc) ＼ 試料	グ　チ	サ　バ	イサギ
	(cc)	(cc)	(cc)
80	1.27	1.15	1.15
90	1.22	1.07	1.07
95	1.19	0.99	1.02
100	1.16	0.94	1.00
105	1.14	0.90	0.96
110	1.08	0.86	0.92
120	1.05	0.84	0.88

2）蒸溜液の還元性物質含量と過マンガン酸加里消費量との関係

上記の条件で過マンガン酸加里消費量を測定するに当り還元性物質量の多少に拘らず正確な値が得られるか否かを明かにするため稀釈試験を行つた．試料としてはメバル（揮発性塩基窒素 150 mg），グチ（揮発性塩基窒素 130 mg）及びマイワシ（揮発性塩基窒素 143 mg）をそれぞれ蒸気蒸溜して得た溜液を再蒸溜水を以て稀釈して第1図に示した如く種々の濃度の還元性物質の溶液を作り過マンガン酸加里消費量を測定したところ稀釋度と

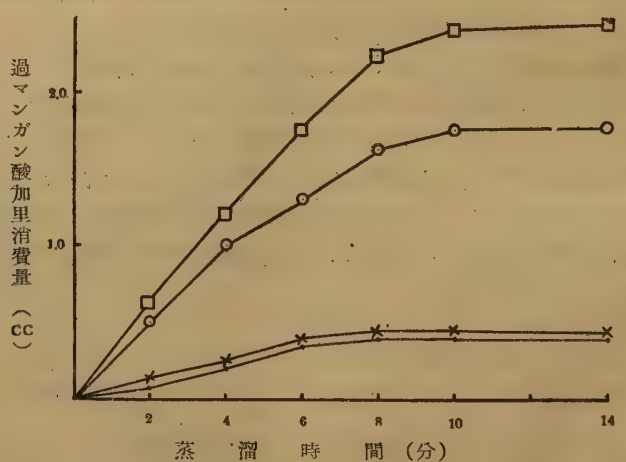


第 1 図．還元性物質の含量と過マンガン酸加里消費量との関係．
（○ グチ，□ マイワシ，× メバル）

0.1 N 過マンガン酸加里溶液の滴定値との間には略々直線的な関係が認められこの実験範囲内では正確な値が得られることを知つた.

3) 試料魚肉の蒸溜時間と過マンガン酸加里消費量との関係

2 g の魚肉を蒸気蒸溜して過マンガン酸加里消費量を測定するに当り蒸溜時間が問題となる. 仍て腐敗初期のサバ（揮発性塩基窒素 27 mg), グチ（揮発性塩基窒素 29 mg）及び完全に腐敗したイサキ（揮発性塩基窒素 86 mg), マイワシ（揮発性塩基窒素 175 mg) を用いて蒸溜時間と過マンガン酸加里消費量との関係を試験した. その結果は第2図に示す如くである. 即ち腐敗初期のサバ, グチでは 8 分間の蒸溜で還元性物質は完全に溜出せしめ得たが完全に腐敗したイサキ, マイワシでは 10 分間の蒸溜で殆ど大部分の還元性物質が溜出されたが 14 分間迄はなお溜出が認められた. 実際の測定に於ては腐敗初期の過マンガン酸加里消費量が問題となるので 10 分間の蒸溜で充分と思われるが第3表に示した如くブランクの値を 0.35 cc とする時は溜液量を正確に 100 cc とする必要があるので溜液が 100 cc となる迄蒸溜するのが適当と考えられる. 著者等の使用した装置では 100 cc の溜液を得るのに約 12 分間を要した.



第 2 図. 魚肉の蒸溜時間と過マンガン酸加里消費量.

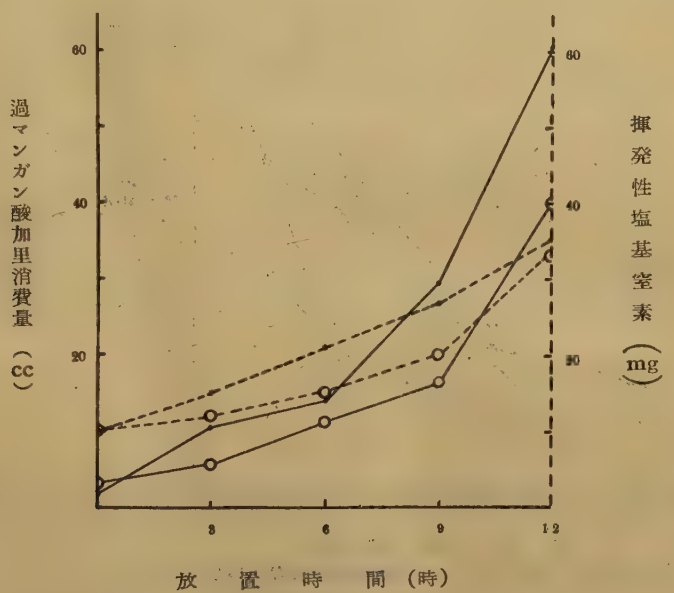
試料 2 g　□ マイワシ（揮発性塩基窒素 175 mg)
○ イサキ（揮発性塩基窒素 86 mg)
× グチ（揮発性塩基窒素 29 mg)
• サバ（揮発性塩基窒素 27 mg)

II. 魚介類の鮮度と過マンガン酸加里消費量との関係

測定方法：磨砕した 2 g の魚肉を 100 cc の溜液を得る迄（10 分間以上）蒸気蒸溜して溜液を 10 cc の 0.1 N 過マンガン酸加里溶液で受ける. 之に 10 cc の硫酸溶液（1 : 1）と数個の予め灼熱した陶土片を加えてアスベスト金網上で加熱し沸騰し始めたら直ちに沸騰湯煎上に 10 分間保つ. 次に之に 10 cc の 0.1 N 蓚酸溶液を加え振盪して生じた沈澱を溶解した後 0.1 N 過マンガン酸加里溶液でミクロビユレツトを用いて逆滴定し滴定値より

ブランクの値を差引いたものを試料 100g に換算して過マンガン酸加里消費量とする.

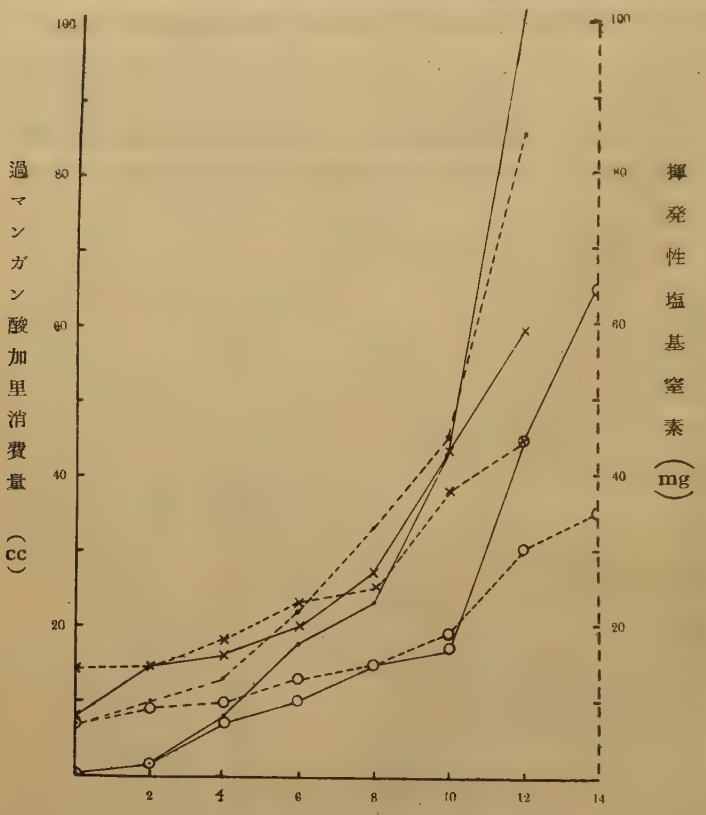
測定結果：実験試料はトビウオ，サバ，イカ，コノシロ，アサリ及び揮発性塩基窒素の測定によつては鮮度を判定し得ない鮫及び竹輪・蒲鉾[4]であつて魚類は骨及び皮を除去したものを，アサリは剝身としたものを，竹輪及び蒲鉾はその儘をそれぞれ磨砕した後 20° 又は 30° に保ち一定時間毎に過マンガン酸加里消費量及び揮発性塩基窒素を測定した．その結果は第3～5図に示す如くである.



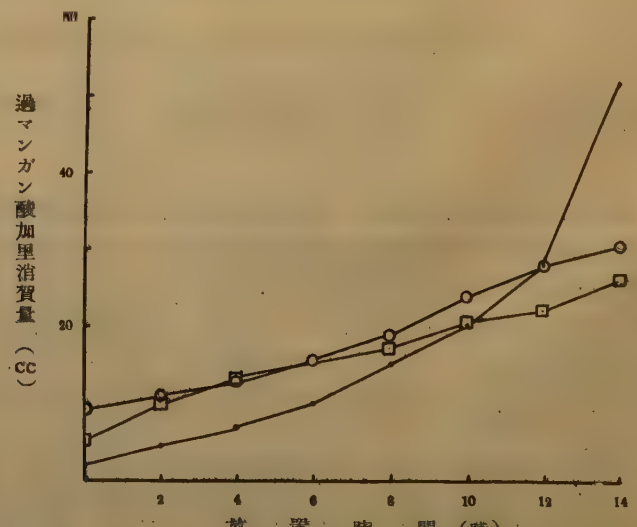
第 3 図. 鮮度低下に伴う過マンガン酸加里消費量の増加 (20°C).
(• トビウオ　○ サバ)
(——過マンガン酸加里消費量 ····揮発性塩基窒素)

20° に於て放置した場合も 30° に於ける場合と同様に初期に於ける過マンガン酸加里消費量は揮発性塩基窒素と略々平行して増加するが，ある時期に至るとその増加は揮発性塩窒素の増加よりも遙かに大きくなりイカを除いた他の試料では腐敗の初期前後に於て両曲線は交叉しており過マンガン酸加里消費量の増加曲線は揮発性塩基窒素の増加曲線より遙かに急激な変化を示している．腐敗初期に於ける過マンガン酸加里消費量は揮発性塩基窒素に於ける場合と同様に魚種により異り一定値を示さなかつたが 20 cc～30 cc の範囲内にあつた.

カスザメは第3，4図に示した他の魚類と同一傾向の過マンガン酸加里消費量増加曲線を示し 20 cc が腐敗初期であつたが，蒲鉾及び竹輪の増加曲線は魚類に比して緩慢であり，これ等の腐敗初期はそれぞれ 19.0 cc，17.5 cc であつた.



第 4 図. 鮮度低下に伴う過マンガン酸加里消費量の増加 (30°C).
（• イカ　○ コノシロ　× アサリ）



第5図. 鮮度低下に伴う過マンガン酸加里消費量の増加 (30°C).
（• カスザメ　○ 蒲鉾　□ 竹輪）

総　括

1．揮発性還元性物質の過マンガン酸加里消費量による魚介類の鮮度測定方法を吟味し，魚介類・鯖鉾等の鮮度低下に伴う過マンガン酸加里消費量の増加と揮発性塩基窒素の増加とを比較検討した．

2．過マンガン酸加里，硫酸の濃度及び還元性物質の酸化に要する加熱時間は 100 cc の魚肉の蒸気蒸溜液を 10 cc の 0.1 N 過マンガン酸加里溶液で受けた後 10 cc の硫酸溶液（1：1）を加え直火煮沸後沸騰湯煎上に 10 分間保てば充分である．

3．蒸溜に要する時間は試料 2 g を蒸気蒸溜して正確に 100 cc の溜液を得る迄の時間（約 12 分間）でよい．

4．鮮度低下に伴う魚介類の過マンガン酸加里消費量の増加曲線は揮発性塩基窒素の増加曲線より遙かに鋭い変化を示している．腐敗初期の値は魚種により一定していないが 20 cc～30 cc の範囲内にある．

5．揮発性塩基窒素を測定する方法によつては鮮度を判定し得ない鮫も本法によれば鮮度を判定し得る．鯖鉾・竹輪に於ては過マンガン酸加里消費量の増加は魚介類に比して緩慢である．

文　献

1） R. Strohecker, R. Vaubel und H. Kirchberg: Z. anal. Chem., **110**, 1 (1937).
2） L. Farber: Food, **18**, 24 (1949).
3） 三宅泰雄，松居秀夫：水の化学分析法，137 (1943).
4） 清水亘，本橋邦郎：水産製造会誌，**3**, 217 (1935).

（九州大学農学部水産化学教室，九州大学農学部附属水産実験所）

Résumé

A method of freshness determination based on $KMnO_4$-consumption of the steam distillate has been proposed. The procedure is as follows:

Steam-distil 2 g of a minced sample until 100 cc of distillate is obtained, catching it with 10 cc of 0.1 N $KMnO_4$ solution, then acidify with 10 cc of H_2SO_4 solution (1:1). Heat the solution on an asbestos-covered plate by a direct flame until it boils, after putting in it a number of fragments of kaolin plate, then place it at once on a boiling water bath for exactly 10 minutes. Introduce 10 cc of 0.1 N oxalic acid solution to this. Shake well in order to dissolve the produced precipitate. Then titrate back with 0.1 N $KMnO_4$ solution. Subtract the blank value from the amount of $KMnO_4$ consumed and calculate the subtracted value for 100 g of the sample.

By the method mentioned above, the increasing amounts of consumed $KMnO_4$ of several kinds of fishes, shell-fish and "Kamaboko" have been measured. The increasing curve of the amounts of $KMnO_4$-consumption was sharper than that of volatile basic nitrogen which is usually measured as an index of spoilage. The amount of $KMnO_4$-consumption at an early stage of spoilage was different according to the kinds of fishes, at 20～30 cc. Satisfactory result was obtained with shark fish, the freshness of which can not be determined by measuring volatile basic nitrogen, though its increasing curve was not so sharp as those of other fishes.

THE PELAGIC COPEPODS OF THE IZU REGION

O. TANAKA

Faculty of Fisheries,
Nagasaki University and Faculty of Agriculture,
Kyūshu University

Reprinted

from

Records of Oceanographic Works in Japan

Vol. 1, No. 1 (1953) March

Published by

Japanese National Commission for UNESCO

THE PELAGIC COPEPODS OF THE IZU REGION

O. TANAKA

Faculty of Fisheries, Nagasaki University and Faculty of Agriculture, Kyūshu University

1. *Introduction.* The present paper is the result of a study of the pelagic Copepoda, Calanoida, collected in the Izu region during the years 1936 to 1940. The first vertical haul from the depth 500 m to 250 m in Suruga Bay, brought up some interesting species which had never been obtained in the surface layer. The present collection was carried out, following the first deep water haul, in the sea area surrounding the Izu Peninsula. 135 vertical hauls were made, chiefly from the depth 1000 m to the surface. Quantitative vertical collections were also taken at different depths with a closing net of 60 cm. in diameter, but they convinced the author that the materials are not sufficient to give a good representation of the vertical distribution of the animals, and a good deal of further study is necessary. There have also been examined some surface collections taken during the years 1930 to 1936 at Misaki, Sagami Bay.

The work was commenced at the Misaki Marine Biological Station connected with the Fishery Department of Tokyo Imperial University, and completed at the Mitsui Institute of Marine Biology in the year 1941.

Before going further the author wishes to express his hearty gratitude to Prof. Dr. Amemiya for his kind encouragement rendered during the study. It is also a great pleasure to extend my best thanks to Mr. T. N. Mitsui, the founder of the Institute, for affording me the opportunity of studying the Copepoda of the Izu region.

It will be a pleasure to me if the present study can add some to the knowledge of the geographical distribution of these small animals.

The Izu region lies in the sub-tropical region of the North Pacific, and is near the latitude where the northern and southern currents meet and overlap, so the material consists of four distinct faunas: the first of them is the endemic species of the area itself; the second is the southern species brought up by the warm Kuroshiwo-current; the third is the northern species brought down by the cold Oyashiwo-current; finally there are in the deeper layers the copepods with a wide range of

geographical distribution. The warm water species of the neighbouring waters of Japan have been nearly completely investigated, and proved to be much like those in other regions of the oceans. In the Izu region, while the warm water species are confined to the upper layer, down to 200 m from the surface, the northern cold water species are obtaind chiefly from the deep layer below 200 m; that is the northern cold water masses brought southwards by the Oyashiwo-current carry with them some boreal species into the intermediate layer of the Izu region, such as *Calanus cristatus* Krocyer, *Mctridia lucens* Boeck and *Metridia longa* Lubbock. The species inhabiting the deep waters are, as F. Dahl stated, completely or nearly completely alike in all the oceans; some of them which have been esteemed to be the characteristic fauna of the Antarctic were proved to be common in the deep waters of the oceans: for instance, *Drepanopsis frigidus* Wolfenden, *Cephalophanes frigidus* Wolfenden, *Scaphocalanus impar* Wolfenden, *Scolecithricella glacialis* Giesbrecht, *Isochaeta ovalis* Giesbrecht have been detected in the present collection. Indeed, a great majority of copepods are cosmopolitan; a wide distribution is the rule rather than the exception.

2. *Material and Method.* The present material was collected in Sagami and Suruga Bays from a small collecting boat, equipped with a wire rope of 4 mm in diameter, and 2,000 m in length. 135 vertical hauls, chiefly from the depth 1,000m to the surface, were made in the 4 stations as given below:

Station A	35°02′N 139°15′E	Sagami Bay, 8 miles east of Ajiro
Station B	34°40′N 139°10′E	9 miles east of Shimoda
Station C	34°36′N 138°35′E	Suruga Bay, 13 miles west of Irô-saki
Station D	34°58′N 138°42′E	Suruga Bay, 4 miles west of Heda

The nets used in the collections were made of stramin, and coarse silk with 29 meshes to a centimeter. The nets were 100 cm. and 60 cm. in diameter respectively; the small one had a closing apparatus.

The gatherings made by the closing net were counted in most cases, while those made with the larger instrument were looked through and only the scarce species were estimated.

3. *Systematic List of the Species.* Up to the present time our knowledge of the copepods of Japanese waters has been limited to the species living in the upper layers of the ocean, and is included in the following papers:

Marukawa, H. (1908). From off the coast of Prov. Boshu, Izu and Suruga.
Marukawa, H. (1921). From the northern waters of Japan.
Marukawa, H. (1928). From the Japan Sea.

Mori, T. (1937). From the neighbouring waters of Japan.

Sato, Ch. (1913). From the neighbouring waters of Hokkaido.

Tanaka, O. (1935). From Sagami Bay.

Tanaka, O. (1935). From Suruga Bay.

Tanaka, O. (1938). From Sagami Bay.

Yamada, T. (1933 and 1935). From the neighbouring waters of Chosen.

Among these, Mori's work includes almost all the surface-living species of Japanese waters. My previous works on Sagami and Suruga Bays include 23 species of Calanoida, of which 5 have been reported by Mori and others, and if the remaining 18 species are added to the 130 species recorded by Mori and others, they bring the total number of Copepods, Calanoida in Japanese waters to 148 species up to that time.

In addition to the above accounts dealing with the copepods of Pacific waters we have the following reports:

Esterly, C. O. (1905, 1906, 1911, 1913, 1924). From the San Diego Region.

Johnson, M. W. (1936). From the North Pacific.

Johnson, M. W. (1938). From the Northeast Pacific.

Finally we have the reports of the "Siboga" collection in the Malay Archipelago which lies midway between the Pacific and Indian Oceans. The report of Calanoida of the Indian Seas by Sewell is one of the most complete ones. Then we have copepods of the South Pacific reported by Farran from the Great Barrier Sea. These three works contain very interesting suggestions concerning the distribution of the copepods in the Pacific Ocean.

In the following is given a systematic list of the species belonging to the Suborder Calanoida obtained in the present collection, and the species hitherto recorded from Japanese waters. (The latter is marked with an asterisk)

Tribe Ampharaskandria

Family CALANIDAE

Genus Calanus Leach

finmarchicus (Gunners)
tenuicornis (Dana)
tonsus Brady
cristatus Kröyer
**hyperboreus* Kröyer
**plumchrus* Marukawa
minor (Claus)

Genus Calanoides Brady

brevicornis (Lubbock)

Genus Canthocalanus A. Scott

pauper (Giesbrecht)

Genus Neocalanus Sars

gracilis (Dana) — *robustior* (Giesbrecht)

Genus Megacalanus Wolfenden

longicornis Sars

Genus Undinula A. Scott

darwini (Lubbock) — *vulgaris* (Dana)

Family EUCALANIDAE

Genus Eucalanus Dana

attenuatus (Dana) — *mucronatus* Giesbrecht

elongatus (Dana) — *pileatus* Giesbrecht

bungii bungii Johnson — *subcrassus* Giesbrecht

bungii californicus Johnson — *subtenuis* Giesbrecht

crassus Giesbrecht

Genus Rhincalanus Dana

cornutus Dana — *nas*utus Giesbrecht

Genus Mecynocera Thompson

clausi Thompson

Family PARACALANIDAE

Genus Paracalanus Boeck

aculeatus Gieshrecht — *parvus* Giesbrecht

denudatus Sewell

Genus Acrocalanus Giesbrecht

gracilis Giesbrecht — *gibber* Giesbrecht

longicornis Giesbrecht — **A. monachs* Giesbrecht.

Genus Calocalanus Giesbrecht

pavo (Dana) — *pavoninus* Farran

plumulosus (Claus) — *gracilis* sp. nov.

styliremis Giesbrecht

Family PSEUDOCALANIDAE

Genus Clausocalanus Giesbrecht

arcuicornis (Dana) — *pergens* Farran

furcatus (Brady)

Genus Ctenoclanus Giesbrecht

vanus Giesbrecht

Genus Pseudocalanus Boeck

minutus (Kröyer) — **gracilis* Sars

Genus Microcalanus Sars

pygmaeus Sars

Genus Mimocalanus Parran

cultrifer Farran

Genus Spinocalanus Giesbrecht

abyssalis Giesbrecht — *angusticeps* Sars

spinosus Farran — *longipes* sp. nov.

magnus Wolfenden

Genus Monacilla Sars

typica Sars — *gracilis* (Wolfenden)

typica var, asymmetrica var. nov.

Genus Drepanopsis Wolfenden

frigidus Wolfenden — *orbus* sp. nov.

Genus Ryocalanus gen. nov.

infelix sp. nov.

Family AETIDEIDAE

Genus Aetideus Brady

armatus (Boeck) — *bradyi* A. Scott

giesbrechti Cleve — *acutus* Farran

Genus Aetideopsis Sars

multiserrata Wolfenden — *divergens* sp. nov.

cristata sp. nov.

Genus Undinopsis Sars

**armatus* (Brady) — *angustus* sp. nov.

Genus Chiridius Giesbrecht

gracilis Farran — *molestus* sp. nov.

poppei Giesbrecht — *cacnosus* sp. nov.

longispinus sp. nov. — *carnosus* sp. nov.

Genus Chiridiella Sars

macrocactyla Sars — *brachydactyla* Sars

Genus Gaidius Giesbrecht

tenuispinus (Sars) — *minutus* Sars

brevispinus Sars — *pungens* Giesbrecht

Genus Gaetanus Giesbrecht

kruppi Giesbrecht — *miles* Giesbrecht

armiger Giesbrecht — *pileatus* Farran

minor Farran

Genus Euchirella Giesbrecht

rostrata Giesbrecht — *trigrada* sp. nov.

pulchra (Lubbock) — *areata* sp. nov.

messinensis (Claus) — *curticauda* Giesbrecht

venusta Giesbrecht — *bitumida* With

intermedia With — *amoena* Giesbrecht

Genus Chirundina Giesbrecht

streetsi Giesbrecht

Genus Pseudochrella Sars

pustulifera Sars — *dura* sp. nov.

tuberculata sp. nov.

Genus Chirundinella gen. nov. — *cara* sp. nov.

Genus Undeuchaeta Giesbrecht

plumosa (Lubbock) — *major* Giesbrecht

magna sp. nov.

Genus Valdiviella Steuer

oligarthra Steuer

Family EUCHAETIDAE

Genus Euchaeta Phillipi

marina Prestandrea — *plana* Mori

wolfendeni A. Scott — *media* Giesbrecht

longicornis Giesbrecht — *pubera* Sars

concinna Dana — *spinosa* Giesbrecht

Genus Pareuchaeta A. Scott

russeli (Farran) — *nitida* sp. nov.

simplex sp. nov. — *scotti* (Farran)

barbata (Brady) — *crassa* sp. nov.

malayensis Sewell — *tonsa* (Giesbrecht)

confusa sp. nov. — *elongata* (Esterly)

calva sp. nov. — *hanseni* (With)

aequatorialis nom. nov. — *comosa* sp. nov.

bisinuata (Sars) — *flava* Giesbrecht

sarsi (Farran)

Family PHAENNIDAE

Genus Phaenna Claus

spinifera Claus

Genus Onchocalanus Sars

affinis With — *cristatus* (Wolfenden)

Genus Xanthocalanus Giesbrecht

pinguis Farran — *legatus* sp. nov.

profundus Sars — *penicillatus* sp. nov.

fallax — *pectinatus* sp. nov.

echinatus

Genus Amallophora T. Scott

serratus sp. nov. — *crassirostris* sp. nov.

cornifer sp. nov. — *oculatus* sp. nov.

irritans sp. nov.

Genus Cornucalanus Wolfenden

indicus Sewell

Genus Cephalophanes Sars

frigidus Wolfenden

Family SCOLECITHRICIIDAE

Genus Lophothrix Giesbrecht

frontalis Giesbrecht — *humilifrons* Sara

Genus Undinothrix gen. nov.

spinosa sp. nov.

Genus Scottcalanus Sars

securifrons (T. Scott) — *longispinus* A. Scott

helenae (Lubbock) — *rotundatus* sp. nov.

australis Farran

Genus Scaphocalanus Sars

magnus (T. Scott)

affinis Sars — *sub-brevicornis* (Wolfenden)

glacialis (Giesbrecht) — *macropes* sp. nov.

elongatus A. Scott — *echinatus* Farran

major (T. Scott) — *curtus* Farran

impar (Wolfenden) — *temporalis* sp. nov.

brevicornis G.O. Sars. — **pacificus* Mori

longifurca (Giesbrecht) — *gracilicauda* Tanaka

Genus Racovitzanus Giesbrecht

levis sp. nov. — *nanus* sp. nov.

Genus Scolecithrix Brady

danae (Lubbock) — *nicobarica* Sewell

Genus Scolecithricella Sars

bradyi (Giesbrecht) — *modica* sp. nov.

**minor* (Brady) — *gracilis* Sars

**orientalis* Mori — *propinqua* Sars

vittata (Giesbrecht) — *emarginata* Farran

abyssalis (Giesbrecht) — *valida* Farran

dentata (Giesbrecht) — *sarsi* nom. nov.

profunda (Giesbrecht) — *arcuata* Sars

longipes (Giesbrecht) — *lamellifer* sp. nov.

tenuiserrata (Giesbrecht) — *spinata* sp. nov.

beata sp. nov. — *timida* sp. nov.

avia sp. nov. — *denticulata* sp. nov.

ctenopus (Giesbrecht) — *lanceolata* sp. nov.

ovata (Farran) — *sp.*

Family THARYBIDAE

Genus Tharybis Sars

sagamiensis sp. nov.

Genus Undinella Sars

oblonga Sars — *simplex* Wolfenden

frontalis Tanaka — *spinifer* sp. nov.

Tribe Heterarthrandria

Family CENTROPAGIDAE

Genus Centropages Herrick

calaninus (Dana) — *brady* Wheeler

gracilis (Dana) — *abdominalis* Sato

furcatus (Dana) — *yamadai* Mori

orsinii Giesbrecht — *violaceus* (Claus)

longicornis Mori

Family DIAPTOMIDAE

Genus Pseudodiaptomus Herrick

**marinus* Sato

Family TEMORIDAE

Genus Temora Baird

turbinata (Dana) — *discaudata* Giesbrecht

stylifera (Dana)

Genus Eurytemora Giesbrecht

**herdmanii* Thompson and A. Scott — **pacifica* Sato

Family METRIIDAE

Genus Metridia Boeck

curticauda Giesbrecht — *brevicauda* Giesbrecht

venusta Giesbrecht — *longa* Lubbock

princeps Giesbrecht — *lucens* Boeck

Genus Pleuromamma Giesbrecht

abdominalis (Lubbock) — *indica* Wolfenden

xiphias Giesbrecht — **robusta* Giesbrecht

gracilis Claus

Family LUCICUTIIDAE

Genus Lucicutia Giesbrecht

ovalis Wolfenden — *flavicornis* (Claus)

longiserrata Giesbrecht — *curta* Farran

sewelli sp. nov. — *lucida* Farram

longispina sp. nov. — *sarsi* nom. nov.

macrocera Sars — *wolfendeni* Sewell

magna Wolfenden — *maxima* Steuer

clausi Giesbrecht — *bicornuta* Wolfenden

Genus Isochaeta Giesbrecht

ovalis Giesbrecht

Family HETERORHABDIDAE

Genus Heterorhabdus Giesbrecht

papilliger (Claus) — *spinifrons* (Claus)

dubius sp. nov. — *subspinifrons* sp. nov.

devius sp. nov. — *vipera* (Giesbrecht)

fistulosus sp. nov. — *compactus* Sars

vicinus sp. nov. — *robustus* Farran

abyssalis Giesbrecht — *tenuis* sp. nov.

pilosus sp. nov.

Genus Heterostylites Sars

longicornis (Giesbrecht) — *major* (Dahl)

Genus Hemirhabdus Wolfenden

grimaldi (J. Richard) — *latus* Sars

Genus Mesorhabdus Sars

brevicaudatus (Wolfenden)

Genus Disseta Giesbrecht

palumboi Giesbrecht — *maxima* Esterly

Family AUGAPTILIDAE

Genus Euaugattilus Sars

nodifrons Sars — *niveus* sp. nov.

farrani Sars — *nudus* sp. nov.

laticeps Sars — *marginatus* sp. nov.

filigerus (Claus) — *bullifer* (Giesbrecht)

magnus Wolfenden — *longimanus* Sars

oblongus Sars — *hecticus* (Giesbrecht)

palumboi (Giesbrecht) — *rigidus* Sars

facilis (Farran)

Genus Augaptilus Giesbrecht

anceps Farran — *glacialis* Sars

longicaudatus (Claus)

Genus Haloptilus Giesbrecht

longicornis (Claus) — *spiniceps* (Giesbrecht)

setuliger sp. nov. — *ornatus* (Giesbrecht)

acutifrons (Giesbrecht) — *longiceps* sp. nov.

oxycephalus (Giesbrecht) — **mucronatus* (Claus)

Genus Pseudaugaptilus Sars

orientalis sp. nov.

Genus Pachyptilus Sars

abreviatus Sars — *pacificus* Johnson

eurygnathus Sars

Family ARIETELLIDAE

Genus Arietellus Giesbrecht

simplex Sars — *giesbrechti* Sars

Genus Paraugaptilus Wolfenden

buchani Wolfenden

Genus Phyllopus Brady

helgae Farran — *impar* Farran

bidentatus Brady — *mutatus* sp. nov.

Family CANDACIIDAE

Genus Candacia Dana

bipinnata (Giesbrecht)
pachydactyla (Dana)
curta (Dana)
aethiopica (Dana)
bradyi A. Scott
catula (Giesbrecht)
truncata (Dana)
bispinosa (Claus)
longimana (Claus)
norvegica Boeek
grandis sp. nov.
**discaudata* A. Scott
**simplex* Giesbrecht
**pectinata* Brady
**pacifica* Mori

Family PONTELLIDAE

Genus Calanopia Dana

elliptica (Dana)
minor A. Scott
**thompsoni* A. Scott

Genus Anomalocera Templeton

**patersoni* Templeton

Genus Labidocera Lubbock

acutifrons (Dana)
acuta (Dana)
detruncata (Dana)
pavo Giesbrecht
kröyer (Brady)
minuta Giesbrecht
japonica Mori
bipinnata Tanaka
**euchaeta* Giesbrecht
**rotunda* Mori

Genus Pontella Dana

securifer Brady
princeps Dana
fera Dana
chierchiae Giesbrecht
kieferi Pesta
**longipedata* Sato

Genus Pontellopsis Brady

regalis (Dana)
villosa Brady
armata Giesbrecht)
yamadae Mori
**perspicax* (Dana)
**tenuicauda* Giesbrecht

Genus Pontellina Dana

plumata (Dana)

Family PARAPONTELLIDAE

Genus Bathypontia Sars

longipes sp. nov.
longicornis sp. nov.
similis sp. nov.

Family ACARTIDAE

Genus Acartia Dana

clausi Giesbrecht

steueri Smirnov

amboinensis Carl

pacifica Steuer

danae Giesbrecht

negligens Dana

**spinicauda* Giesbrecht

**longiremis* Lilljeborg

**bifilosa* Giesbrecht

**erythraea* Giesbrecht

**hamata* Mori

Family TORTANIDAE

Genus Tortanus Giesbrecht

forcipatus Giesbrecht

steueri sp. nov.

rubidus sp. nov.

**discaudatus* Thompson and A. Scott

PRINTED BY
KASAI SHUPPAN INSATUSHA
MINATO-KU, TOKYO, JAPAN
東京都港區芝南佐久間町1—53
笠井出版印刷社行印

With the Author's Compliments

Note on *Calanus tonsus* Brady in Japanese Waters

O. TANAKA

Reprinted from the *Journal of the Oceanographical Society of Japan.* Vol. 10 No. 1
May 1954

Note on *Calanus tonsus* Brady in Japanese Waters

By

Otohiko TANAKA

Department of Fisheries, Kyushu University.

Synopsis: *Calanus plumchrus* Marukawa has been believed to be a distinct species in Japan. On closer examination of the adult specimens of the species, taken from the deep waters of the Japan Sea, it revealed that *Calanus plumchrus* is the immature specimen of *Calanus tonsus Brady*.

Introduction

Calanus tonsus was first described by Brady in 1883 from the Atlantic and Pacific Oceans. It has been described by Farran (1929), Campbell (1930), Wilson (1934) and Davis (1949) since. I have collected the adult female specimens of *Calanus tonsus* Brady and *Calanus cristatus* Kröyer from the deep waters of Sagami bay. *Calanus cristatus* is one of the most common species in the northern waters of Japan. There is the another species of Calanus which is very abundant in the same region. The species was first described and figured by Ch. Sato (1913) from the surface water of Hokkaido under the name *Calanus sp.* Marukawa (1921) described the same species, and named it *Calanus plumchrus*. According to Sato and Marukawa, the species is very abundant in the northern cold waters of Japan, and is called "Isada" in Japanese by fishermen. It is one of the most important food for herring and mackerel in the sea surrounding Hokkaido. The species is widely distributed in the northern water of Japan, but it has not been found along the Pacific coast of Japan as far south as the cape Inuboye, Chiba Prefecture. It is also distributed in the Sea of Japan, and has been collected off the coast of San-in District (Furuhashi, 1952, 1953). The specimens hitherto been collected from the surface layer are all immature. Anraku (1952) figured the 5th pair of legs of the adult male taken from the deep water off the west coast of Hokkaido. But none in Japan has noticed that *C. plumchrus* is synonymous to *C. tonsus*.

Neither the adult male nor the immature specimens of *C. plumchrus* have been met with in the Izu region, the Pacific coast of middle Japan, where I had, for a long time, been engaged in the study of the pelagic copepods. I

could have fortunately, during my sojourn in the San-in District in 1953, the adult specimens of *Calanus plumchrus* both female and male by the courtesy of Mr. K. Furuhashi, the member of the Maizuru Marine Observatory. The specimens were collected from the deep water of the Japan Sea by the research ship belonging to the observatory in 1951. On closer examination of the specimens, it revealed that *Calanus plumchrus* and *Calanus tonsus* are the same species, differing only in the developmental stage.

Here, the author expresses the best thanks to Mr. K. Furuhashi who placed the precious material to my disposal. The present paper is based on the financial support of a grant from the Scientific Research Fund of the Ministry of Education, to which the author is much indebted.

Description

Female. Length 4.16–4.40 mm. Cepahlothorax elongate ovate. The frontal margin of the head narrowly rounded when viewed from the lateral; there is no crest or process on the frontal margin of the head, but a small lump of oil globule, oval in shape, is observed just beneath the cuticle; fig. 1. a. this lump is more remarkable in the immature specimen. The body is full of oil globules.

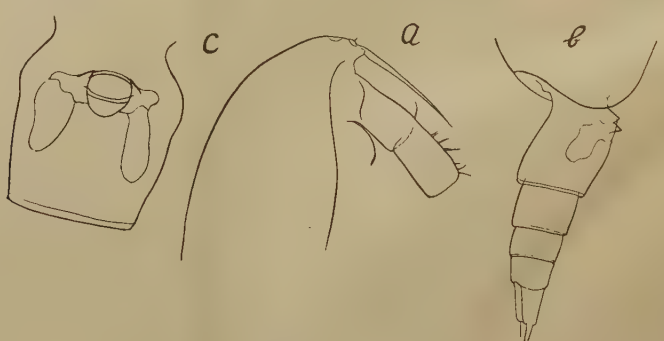


Fig. 1.

Abdomen is contained 3.7-times in the length of the cephalothorax. The abdominal segments and the furca in the proportional lengths

Segment	1+2	3	4	5	Furka
	42	18	13	9	18=100

. Genital flap, in lateral aspect, is produced triangularly in the middle of the genital opening (fig. 1, b, c). The process was not observed in my previous female specimen of *C. tonsus* taken from Sagami bay.

1st antenna broken off in the distal portion. The setae on the anterior

margin of the joints are feeble. 2nd antenna of usual Calanus-type. Mandible pulp has a broad 2nd basal joint which is furnished with 4 setae on the inner margin; the exopodite is longer than the endopodite; the 1st joint of the endopodite carries a sack-shaped protuberance, and 2 long and 2 short setae on the inner distal margin; the 2nd joint of the endopodite has 9 long and 2 short setae on the distal margin; the cutting edge smooth, with only several reduced teeth. 1st maxilla has a naked 1st inner lobe; the 2nd inner lobe naked or with 2 small setae; my previous specimen has a single seta on the 2nd inner lobe. 5th pair of legs have no serration on the inner margin of the 1st basal joint.

Male. Length 4.40–4.82 mm. Head is separated from the thoracic segment, and so is the 4th from the 5th. Head dilated in the oral region when viewed from the dorsal; the greatest width about 1/3 the length of the cephalothorax. In lateral view the frontal margin of the head is evenly rounded. There is a remarkable ridge on the mid-dorsal line, about the anterior 1/4 of the head. The posterior margin of the head distinctly produced in the mid-dorsal line when viewed from the lateral (fig. 2, a, b). The lateral corner of the last thoracic segment rounded; it extends posteriorly about to the middle of the genital segment. Rostrum consists of 2 slender filaments. Frontal organ slightly perceptible.

Abdomen 5-jointed, and is contained 3-times in the length of the cephalothorax. The segments are in the proportional lengths $\frac{\text{Segm. } 1 \quad 2 \quad 3 \quad 4 \quad 5 \quad \text{Furka}}{32 \quad 11 \quad 32 \quad 19 \quad 14 \quad 10 \quad 14} = 100.$ The genital opening on the left side of the 1st segment. Furcal rami pararell, 1.34-times as long as wide.

1st antenna 24-jointed. While the female 1st antenna is feeble, and in most specimens it is broken off in the distal portion, the male 1st antenna is strong and well kept. The antenna extends posteriorly beyond the end of the furca by distal 4 joints. The joints are in the following proportional lengths:

$$\frac{1\sim2 \quad 3 \quad 4 \quad 5 \quad 6 \quad 7 \quad 8 \quad 9 \quad 10 \quad 11 \quad 12 \quad 13 \quad 14 \quad 15 \quad 16 \quad 17 \quad 18 \quad 19 \quad 20 \quad 21 \quad 22 \quad 23 \quad 24 \quad 25}{103 \quad 41 \quad 38 \quad 41 \quad 38 \quad 38 \quad 24 \quad 24 \quad 35 \quad 35 \quad 41 \quad 45 \quad 48 \quad 46 \quad 46 \quad 46 \quad 46 \quad 52 \quad 45 \quad 45 \quad 38 \quad 31 \quad 24 \quad 21} = 1000;$$

the joints 1–2, 3, 7, 14, 18, 21 and 24 are each furnished with a long seta; the joints 1 to 18, and the joint 25 have each well-developed aesthetask. 2nd antenna has the endopodite about as long as the exopodite; the 1st joint of the endopodite swollen on the inner distal corner, and carries 1 long and 1 short setae. Mandible as in the adult female: the broad 2nd basal joint has 2 short setae, a small process furnished with a small seta, and a short seta on the inner margin; the exopodite 1.7-times as longas the endopodite; the 1st joint of the endopodite

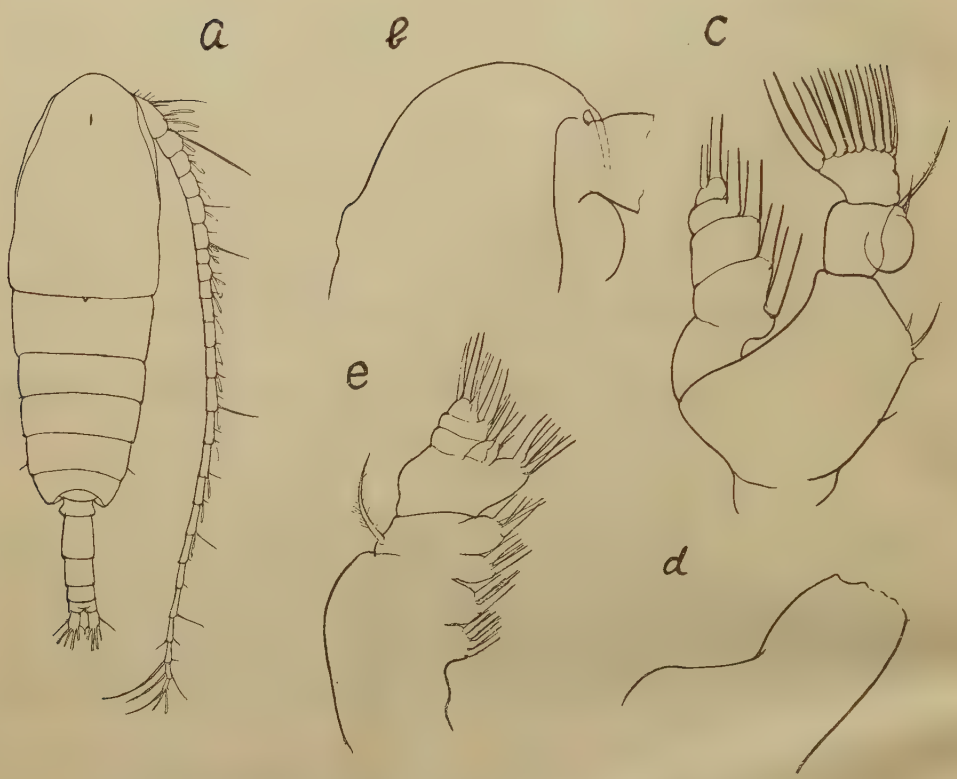


Fig. 2.

has a sack-shaped protuberance, and 2 setae on the inner distal margin; the cutting edge soft-skined, and has only 4 reduced teeth (fig. 2, c, d). 1st maxilla as that of the adult female: the 1st inner lobe is devoid of seta; the 2nd inner lobe has 2 short setae; the 3rd inner lobe which is furnished with fine hairs on the inner margin has 4 rather long setae; the 1st joint of the endopodite has 4 setae on the inner margin; the 2nd joint of the endopodite has 3 setae; the 3rd joint has 6 setae on the distal margin; the exopodite has 11 setae; the 1st outer lobe has 7 long and 3 short setae on the anterior margin; the 2nd outer lobe naked. 2nd maxilla well deveoloped: the outer margin of the 1st basal joint arched; the spinulation on the inner lobes as of usual Calanus-type (fig. 2, e). The 1st and 2nd basal joints of maxillipede are about of equal lengths; the joints are very voluminous when compared with those of the adult female; the external setae on the 4th and 5th joints of the endopodite are very strong and curved (fig. 3, a).

Swimming legs have each 3-jointed exopodite and endopodite. 1st leg has an

Fig. 3.

inner marginal setae on the 1st basal joint; the 2nd basal joint has a curved inner distal seta; the 1st joint of the exopodite has, beside an usual inner marginal seta, a small conical process which can be easily observed without dissection in lateral view; this peculiar process is observed also in the female 1st leg; the outer edge spine on the 1st joint of the exopodite are strong, reaching to the distal margin of the joint; the 2nd joint of the exopodite has a strong outer-edge spine and an inner marginal seta; the 3rd joint of the exopodite has 2 small outer marginal spines, a slender terminal spine, and 4 inner marginal setae; the terminal spine is longer than the 3rd joint of the exopodite (fig. 3, b). In the 2nd leg the 1st basal joint has an inner marginal seta; the 2nd basal joint has a strong outer edge spine; the inner margin of the 1st joint of the exopodite is slightly swollen near the proximal end; the terminal spine of the 3rd joint of the exopodite is much shorter than the joint itself (19:24), and has weakly serrated lamella (fig. 3, c). 3rd and 4th legs as in the 2nd leg. The outer marginal spine of the 3rd joint of the 2nd to 4th legs divide the outer margin in the following proportional lengths:

	proximal	distal
2nd leg	22	23
3rd leg	28	29
4th leg	32	26

In the 5th legs the 1st basal joint has no inner marginal seta; the hairs on the inner margin absent; the 2nd basal joint has each an outer distal spine. The right 5th leg is not greatly modified: it is about as long as the left 5th leg; the 1st and 2nd joints of the exopodite have each an outer edge spine; the 2nd joint has a small spine on the inner margin about distal 1/3 of the joint; the 3rd joint has 2 outer marginal spines; the terminal spine is about half the length of the 3rd joint of the exopodite; the inner margin of the 3rd joint is smooth. The endopodite of the right leg extends about to the proximal 1/3 of the 3rd joint of the exopodite; the 1st and 2nd joints of the endopodite have each an inner marginal seta and an outer edge spine; the 3rd joint has 2 outer marginal, 2 apical and 2 inner marginal setae; the outer edge spine at the base of the apical seta is very small. The left 5th leg is modified: the 1st joint of the exopodite is about 2-times as long as the 3rd joint of the exopodite; the inner margin of the joint is furnished with hairs; the 2nd joint of the exopodite is broad, with an outer edge spine; the inner margin of the joint is covered with hairs; the 3rd joint of the exopodite is small, carrying a single small outer marginal spine and 2 apical spines, of which the outer one

is short; the inner one is about half the length of the 3rd joint of the exopodite; the inner margin of the 3rd joint is slightly sinuate, and is furnished with short clumsy hairs; the 3rd joint of the endopodite of the left leg reaches the distal margin of the 2nd joint of the exopodite, and is similar in structure to that of the right leg. fig. 3, d.

Immature specimen. Length 4.26–4.45 mm. The specimen is in the 5th copepodid stage. The discrimination of two sexes was not determined in this stage of the development. General appearance as in the adult female. The lense-shaped protuberance on the frontal margin of the head is more remarkable than in the adult female (fig. 4, a).

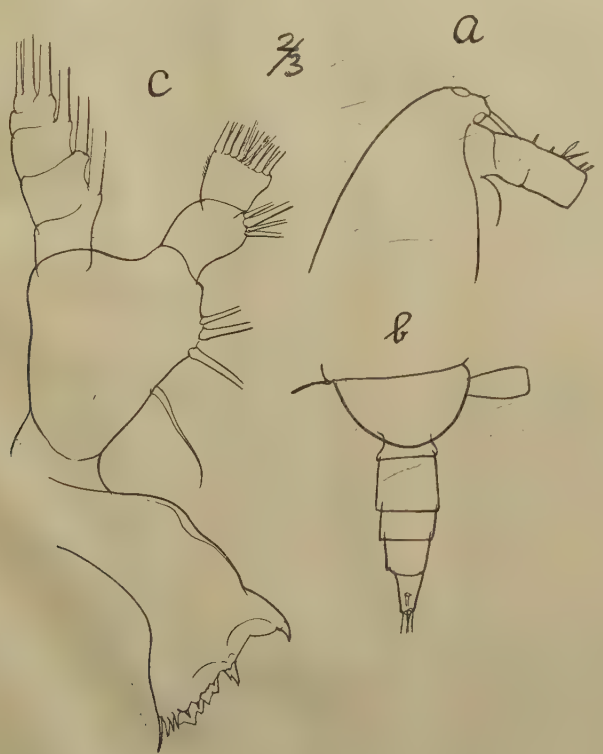


Fig. 4.

Abdomen 4-jointed, and is contained about 4.0-timed in the length of the cephalothorax. The abdominal segments and the furca in the proportional lengths $\frac{1\ \ 2\ \ 3\ \ 4\ \ \text{Furka}}{14\ 29\ 17\ 14\ \ 26}=100$. Furcal rami pararell, 2-times as long as wide.

1st antenna exceeds the end of the furca by distal 3 joints; the setae on

the joints are very feeble; the 1st and 2nd joints are separated on the posterior margin; the line of demarcation is undetectable on the anterior margin. 2nd antenna as in the adult female. Mandible has no sack-shaped tubercle on the 1st joint of the endopodite. The cutting edge has well-developed teeth (fig. 4, 2). 1st maxilla has a well-developed 1st inner lobe; it is furnished with 9 strong marginal spines and 4 setae; the 2nd inner lobe has 4 long setae; the 3rd inner lobe has 3 setae; the 2nd basal joint has 5 setae; the 1st joint of the endopodite has 4; the 2nd joint has 3; the 3rd joint has 5 setae; the exopodite has 10 setae; the 1st outer lobe has 7+2 setae; the 2nd outer lobe has 1 seta. 2nd maxilla well developed: the setae on the inner lobe are stronger than those in the adult female; the outer marginal seta on the 1st basal joint is slender. The 1st basal joint of the maxillipede is broad, about half as wide as long; the setae on the inner lobes are very strong; these setae are much reduced in the adult female.

1st to 4th swimming legs have each 3-jointed exopodite and endopodite. The peculiar tubercle on the 1st joint of the exopodite of the 1st leg is faintly visible. 5th leg has 2-jointed endopodite. The exopodite broken off in the distal portion, but it may probably be consisted of 2 joints. The 1st basal joint has no seta or hairs on the inner margin.

Remarks

Campbell (1930) described the adult male of *Calanus tonsus* Brady from the Vancouver Island region. The Russian colleague Brodsky (1938) pointed out that *C. plumchrus* Marukawa is synonym of *C. tonsus* Brady. As the Russian papers are inaccessible in Japan, I have been ignorant of the synonymity of these two species. I have doubted, since I had detected *Calanus cristatus* Kröyer, in Sagami bay, the absence of *C. plumchrus* which is one of the most common species in the northern waters of Japan, from the deep layers of the bay. The northern cold water carries with it the cold water species, such as *Calanus cristatus, Metridia longa, Metridia lucens* and others, in deep layers to the lower latitude along the Pacific coast of Japan. All these species have been detected from the deep and intermediate waters of Sagami bay except *C. plumchrus*. I haxe never thought of that *C. plumchrus* is synonymous to *C. tonsus* before I had been able to examine the specimen both immature and adult of so-called *C. plumchrus* Marukawa. Marukawa's specimens is clearly identical with *C. tonsus* in the 5th copepodid stage, measuring 4.2–5.2 mm. Sato's specimen measured 4.5 mm. Campbell's 4.5–5.0 mm. These immature specimens have 2-jointed exopodite in the 5th pair of legs. The colour of the

Japanese specimen is whitish pellucid; the plumose setae of the 1st antennae and furcal rami are red.

According to Campbell who studied the life history of *C. tonsus* abundant in the Strait of Georgia, the immature specimen in the 5th copepodid stage is found from the middle of May untill January. At that time it is considered as the most important planktonic animal in the general economy of the Strait. The mature female and male come to the surface in January. They exist as an adult for a short period of the year, approximately January and February. The attainment of maturity is characterised by the marked reduction of the mouth appendages, especially that of the cutting edge of the mandible, and the reduced number of setae in the 1st maxilla. The species in the Canadian water appears to pass the greater part of the year in the 5th copepodid stage. During the summer months when the species exists in the 5th copepodid stage the individuals feed intensively on the abundant supply of diatoms avairable at that time, and store up reserved food. These specimens are filled with oils. This accumulated food is used in the egg producing period. Breeding occurrs during April and May in the Strait of Georgia.

The life history of *C. tonsus* in Japanese waters is not well known, but it is probable that the species passes the greater part of the year in deep layers, and comes to the surface during the month April to June when it is in the 5th Copepodid stage. The maturity of the Japanese specimen may, of course, be attained in the 6th copepodid stage. The adult female and male may come to the surface to spawn as it is the case in the Strait of Georgia. But at present the sexual behavior of the animal is entirely unknown in Japanese waters.

Distribution

The species has a wide distribution in the Atlantic and Pacific: Woods Hole region, Maderia and Canary Islands, Gulf of Guinea, off the coast of Urguay; north eastern and western regions of the North-Pacific, off the coast of Chile and New Zea-land. The species has been recorded in Japan from the cold and less salty waters which have a close communication with the Oyashio current: the Okotsk Sea, east and west coasts of Hokkaido, Mutsu bay and the Sea of Japan. The immature specimen is in the surrounding waters of Hokkaido most abundant from April to June in the surface layer when the temperature of the water is about 13-14°C. The adult male of *Calanus plumchrus* was first described in Japan by Yamada (1938) who obtained the

specimen from the stomach content of a larval cod fish taken in the adjacent water of Korea. Nakai (1942) says the adult individuals are widely distributed in the Sea of Japan in the layer between 600–300 m. all the year round. But Kokubo (1950) failed to detect the adult individual in the vertical haul made from the depth 620 m to the surface off the coast of Aomori Prefecture in March 1950. Motoda et al (1950) have obtained the adult male and immature individuals from the depth more than 300 m. off the coast of Hokkaido in the summer 1948. Anraku (1952) collected the adult female individuals from the layer 500–25 m., and the adult male between 1000 and 500 m. in the pacific coast of northern Japan in Nov. 1948. Furuhashi (1953) obtained the adult individuals both female and male from the deep water (500–0 m) of the south-western area of the Sea of Japan in the summer 1952. I have detected several immature individuals from the surface collections made by the Toyama Fisheries Experimental Station in the Sea of Japan in April, 1953. These japanese records of collection indicate that the adult individuals have not yet been obtained from the surface layer, and that true feature of relative abundance of the species which is so important in the economy of japanese waters has been unknown up to the present time.

Bibliography

Anraku, M. 1952: Plankton copepoda collected by R. S. "Yushiwo-maru" in Pacific water to the East of northern Japan during her cruise in November 1948, Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. Vol. 3, No. 1.

Brady, G. S., 1883: Report on the Copepoda. Rep. Sci. Res. Voy. H. M. S. Challenger, Zool., 8, pt. 23.

Brodsky, K. A., 1938: Contribution to the ecology and morphology of *Calanus tonsus* Brady (Calanus plumchrus Marukawa) of far-eastern seas. Compt. Rend. Acad. Sci. U. R. S. S. Vol. 19, pp. 123–126. (inaccessible).

Campbell, H. M., 1930: Some free-swimming Copepoda of the Vancouver Island region. II. Trans. Roy. Soc. Canada Vol. 24, pp. 177-182.

Campbell, H. M., 1934: The Life History and Post Embryonic Development of the Copepoda, *Calanus tonsus* Brady and Euchaeta, japonica Marukawa. J. Biol. Bd. Canada 1 (1).

Davis, Chales C., 1949: The pelagic Copepoda of the North-eastern Pacific Ocean. Univ. Wash. Publ. in Biol. Vol. 14, pp. 1–118.

Farran, G. P., 1928: Crustacea, Pt. X. Copepoda. British Antarctic (Terra Nova) Exped. 1910. Nat. Hist. Rep. Zool. Vol. 8, pp. 203–306.

Furuhashi, K., 1952: Notes on some animal planktons collected from the sea of Japan off San-in District. Publ. Seto Mar. Biol. Lab., II (2).

Furuhashi, K., 1953: On the vertical distribution of animal plankton in the sea of Japan off San-in District in summer of 1952. Publ. Seto Mar. Biol. Lab., Vol. 3, No. 1.

Giesbrecht, W. und O. Schmeil., 1889: Copepoda I Gymnoplea. Das Tierreich, Vol. 6.

Kokubo, S., 1950: The Ecology of Certain Copepoda in the Japan Sea, and Mutsu Bay. Bull. Jap. Soc. Sci Fisheries, Vol. 16, No. 5.

Marukawa, H., 1921: Plankton list and some new species of copepoda, from the northern waters of Japan. Bull. Inst. Oceanog. No. 384.

Marukawa, H., 1928: Nippon-kai no Fuyuseibutsuni ni tsuite (in Japanese). Haiyo Chosa-Iho. Vol. 2, No. 1, pp. 9-12.

Mori, T., 1937: The pelagic Copepoda from the neighbouring waters of Japan. Tokyo.

Motoda, S., Iizuka, A., and Anraku, M., 1950: The distribution of plankton in the north-western water of Hokkaido during the summer 1949 (in Japanese). Hokubu Nippon-kai Shinkai Gyoden Chosa Hokoku.

Nakai, J., 1942: Chosen Maiwashi no Gyokyo to Kaikyo (in Japanese). Kaiyo no Kagaku. Vol. 2, No. 3.

Sato, Ch., 1913: Fuyusei-Tokyakurui (in Japanese). Suisan Chosa Hokoku, No. 1. Hokkaido Fishery Exper. Station.

Tanaka, O., 1953: The pelagic copepoda of the Izu region. Rec. Oceanog. Works in Japan, N. S. Vol. 1, pp. 126-137.

Wilson, C. B., 1932: The copepoda of the Woods Hole region, Massachusetts, Bull. U. S. Nat. Mus. No. 158.

Wilson, C. B., 1949: Copepoda gathered by the U.S. Fisheries Steamer "Albatross" from 1887 to 1909, chiefly in the Pacific Ocean. U. S. Nat. Mus. Bull. 100, Vol. 14, pt. 4.

Yamada, T. 1938: Tokyakurui Sushu no Bunrui ni kansuru chiken-hoi (in Japanese). (Supplementary note on the identification of some Copepods). Suisan Gakkwai Ho, Vol. 7, No. 4.

Explanation of the text-figures

Fig. 1. Adult female.
- a. Head, lateral view, ×25
- b. Abdomen, lateral view, ×25
- c. Genital segment, ventral view, ×50

Fig. 2. Adult male.
- a. Whole animal, dorsal view, ×15
- b. Head, lateral view, ×30
- c. Mandible pulp, ×100
- d. Cutting edge of mandible, ×100
- e. 2nd maxilla, ×100

Fig. 3. Adult male.
- a. Maxillipeda, ×100
- b. 1st leg, ×60
- c. 2nd leg, ×60
- d. 5th pair of legs, ×60

Fig. 4. Immature specimen
- a. Head, lateral view, ×25
- b. Abdomen, lateral view, ×25
- c. Mandible, ×100

潮流のある場合のプランクトン量の水平分布について

川 原 田 裕
(函館海洋気象台 海洋課)

Horizontal Distribution of Plankton with Reference to Tidal Current

By

Y. KAWARADA

(Oceanographical Section, Hakodate Marine Observatory.)

Abstract:—From the results of twenty-four succesive hourly observations at one point 500 meters off the mouth of the River Sagami, in Sagami Bay, the trajectories of observed water masses were followed up to give the original localities.

From these localities horizontal distribution of plankton and water temperature are presumed, giving the reasonable results: plankton density is high near the mouth of the river, and decreases gradually toward the offing.

This distribution of plankton correspond with that of hydrographical conditions; i.e. the distribution of water temperature, chlorinity and oxygen content.

1. 緒 言

潮汐の干満とプランクトン量の変化に関する問題は，既に前報[1]で紹介した如く種々の研究があるが，潮流の変化ある場合はその変化は移流に関係あるべく従つて水平分布が問題になる。本報告は，先に報告した[2]相模川々口附近の海洋観測資料（昭和25年 8 月 30 日～31 日）に基づき測流結果よりプランクトン量の水平分布を求めたものである。

測流は 0, 5, 10, 15, 20 m 層において毎時観測を行つたが，プランクトンは丸川式中層ネツト（口径 30 cm，篩絹 ××13）で 0～25 m の鉛直採集を行つた為，之と比較する関係上 10 m 層の測得流を以つて当時の潮流を代表せしめることにした。

2. 本 論

投錨により船を固定せしめて観測を行う場合，時々刻々に観測された海水は，同時に測定した流速から逆に追跡してその海水が前の時間に在つた位置を計算より求めることが出来る。但し流れは観測地点附近一帯（2, 3 浬以内）に同一の流れを示すと仮定し，従つて考える水塊は観測地点の流れと同じ流れに従うものとする。細かい流れの変動は無視して大略のことを考えることにする。